



HAL
open science

Étude du rôle de CHAC1 dans la modulation de la réponse des cellules épithéliales bronchiques infectées par *Pseudomonas aeruginosa* dans le contexte de la mucoviscidose

Léa Perra

► **To cite this version:**

Léa Perra. Étude du rôle de CHAC1 dans la modulation de la réponse des cellules épithéliales bronchiques infectées par *Pseudomonas aeruginosa* dans le contexte de la mucoviscidose. Maladies infectieuses. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS177 . tel-02454450

HAL Id: tel-02454450

<https://theses.hal.science/tel-02454450>

Submitted on 24 Jan 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat
Sorbonne Université

Spécialité Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Présentée par
Léa PERRA

Pour obtenir le grade de
Docteur en Sciences de Sorbonne Université

**Étude du rôle de CHAC1 dans la modulation de la réponse des
cellules épithéliales bronchiques infectées par *Pseudomonas
aeruginosa* dans le contexte de la mucoviscidose**

Soutenue le
27 septembre 2018

Devant le jury composé de :

Mme le Professeur Annick CLEMENT
Mme le Professeur Pascale FANEN
Mr le Professeur Marc CHANSON
Mr le Professeur Jean-Michel SALLENAVE
Mr le Docteur Loïc GUILLOT

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

« La plus grande gloire n'est pas de ne jamais tomber, mais de se relever à chaque chute. »

Confucius

« Deviens ce que tu es. Fais ce que toi seul peut faire. »

Friedrich Nietzsche

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse. Je remercie le Professeur Annick Clement qui me fait l'honneur de présider mon jury. Je remercie également mes rapporteurs, les Professeurs Pascale Fanen et Marc Chanson, pour le temps qu'ils ont passé à évaluer mon travail. J'adresse également mes remerciements au Professeur Jean-Michel Sallenave qui avait déjà accepté d'être examinateur de mon comité de mi-thèse et qui l'est de nouveau pour ma thèse.

Mes remerciements vont ensuite à mon directeur de thèse, le Docteur Loïc Guillot. Merci de m'avoir permis de faire ma thèse avec toi. Ça n'a pas été facile tous les jours mais j'ai apprécié travailler avec toi, j'espère que toi aussi. Merci pour tes conseils tout au long de ces trois ans ainsi que pour ta bonne humeur quotidienne. Merci pour ton optimisme à toutes épreuves. Merci pour notre éternel débat sur la doudoune sans manches ! J'espère que tu la porteras le jour de ma soutenance.

Je remercie ensuite le Professeur Harriet Corvol de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Merci Olivier, pour avoir été le papa des étudiants du labo. Merci pour ta bienveillance, ta gentillesse et tes conseils précieux. Tu as su quand ça n'allait pas et me faire rire pour que je pense à autre chose. Merci également de m'avoir sauvé des nombreuses intempéries informatiques auxquelles j'ai eu le droit pendant trois ans. Promis, je ne resterai plus à côté de l'imprimante !

Merci à Philippe pour tes conseils ainsi que pour les gâteaux, bonbons, chocolats, glaces et autres... Je pourrai faire un régime après ma thèse !

Je remercie également Nathalie pour ses conseils techniques, pour sa bienveillance ainsi que pour nos conversations en pièce de culture ou dans le bureau que nous avons partagé. Merci de m'avoir écoutée et encouragée.

Merci à Tobias, de m'avoir supportée comme voisine de bureau pendant la rédaction de ma thèse, je nous vois encore délirer sur une figure de ma thèse en disant macrophaaaaages !

Merci aussi d'avoir travaillé sur mon projet et pour toutes tes relectures et corrections de ma thèse.

Je tiens également à remercier Florence. Quand j'ai commencé au labo j'étais ton étudiante, vive le nanodrop ! Merci de m'avoir appris les techniques de labo, merci pour tes conseils et ton soutien pendant ma thèse. Merci d'avoir toujours été là pour m'écouter. Je suis passée en cinq ans de ton étudiante à ton amie et j'en suis ravie. Merci pour tout.

Anastasia ! Ma co-thésarde... On a commencé notre thèse ensemble. Merci d'avoir été là pour moi pendant ces trois ans, d'avoir fait la psy par moments, d'avoir su me remonter le moral quand ça n'allait pas. Bon on a aussi bien rigolé pendant ces trois années, en même temps avec tout ce qu'il t'arrive comme aventures c'est obligé ! Je suis toujours persuadée que tu es folle ! Merci d'être devenue mon amie et j'espère que tu le resteras longtemps.

Merci à Pauline pour toutes les pauses clope auxquelles tu m'as accompagnée. Je te souhaite une belle fin de thèse.

Merci à Sandy, avec qui j'ai passé de très bons moments pendant presque quatre ans. Merci pour tous tes conseils, tes encouragements ainsi que pour ton amitié.

Je tiens également à remercier Sarah. Merci d'avoir été plus méchante que moi dans le centre et d'avoir été la seule à comprendre mon humour noir ! Merci d'avoir fait une quatrième année pour rester avec nous jusqu'à la fin et pour tous les moments que nous avons partagés ensemble !

Je remercie également les étudiantes en M2 du labo, Sophie, Julia et Jeanne.

Merci à Hortense qui a été ma stagiaire pendant 10 mois. Merci d'avoir travaillé sur mon projet, je sais maintenant que je suis une bonne pédagogue.

Merci aussi à tous ceux qui sont passés dans le labo. Nico, la pampa, merci pour ton franc parler marseillais qui a mis de la bonne humeur dans le bureau. Merci Guillaume d'avoir participé avec nous aux olympiades, j'en garde de très bons souvenirs ! Merci aux étudiants de M1, Xavier et Estelle. Xavier j'essaierai de caler « la muviscidose » le jour de l'oral ! Estelle, merci pour les potins dans le bureau étudiant et pour les sorties shopping.

Merci à toutes les personnes du centre que j'ai pu croiser et avec qui j'ai échangé pendant ces trois années : Delphine, A'dem, Malorie, Nawel, Thomas, Astrid, Cindy, Eva, Lyvianne, Marion, Laura, Yannick, Grégoire, Yuan (merci d'avoir été mon voisin de bureau au début de ma thèse), Paul-Patrice, Stephan, Thomas, Kristell, Romane et Clémence.

Je tiens également à remercier les personnes avec qui j'ai travaillé en M2 et qui m'ont donné envie de continuer. Merci à Florent, Camille et Audrey. Un grand merci à Xavier Houard. Merci de m'avoir encadrée pendant mon stage de M2 et de m'avoir soutenue pendant mes trois ans de thèse. Merci de m'avoir écoutée, merci pour tes conseils et ta bienveillance à mon égard. Je t'en suis reconnaissante.

Merci à Vera, Audrey et Dune pour notre amitié qui dure depuis plus de dix ans. Merci de m'avoir soutenue, écoutée et encouragée pendant ces trois années.

Merci à Elsa, on a passé de super moments à la fac et dans le Berry pendant nos balades à cheval. Merci à Anne-Charlotte, on sera libérées de la thèse en même temps à quelques jours près, je te souhaite plein de bonheur et de réussite pour la suite.

Merci à ma partenaire, Marion. Merci de m'avoir toujours écoutée parler de mon projet et du labo même si tu ne comprenais pas tout. Merci pour tous nos délires en tournoi et au bad. Merci d'être toujours là quand j'ai besoin de toi, sans toi ça n'aurait pas été pareil.

Merci à mes amis badistes. Merci à Romain, pour ton amitié, pour tous les tournois qu'on a pu faire et qu'on fera ensemble, ainsi que pour ta nonchalance permanente qui m'apaise. J'espère que l'on continuera les restos du mardi soir. Merci à Kim et Ben, pour votre amitié, votre soutien, surtout cet été qui n'a pas été facile pour moi. Merci d'être entrés dans ma vie. Ben, quand j'aurai fini ma thèse, tu ne m'entendras plus jamais dire « on y va ? » j'aurai tout mon temps ! Kim, merci pour nos longues conversations, pour ton soutien et ta bienveillance inconditionnels. Merci à Néné, pour ta curiosité envers ma thèse, pour m'avoir écoutée et motivée. Merci pour le meilleur surnom « Boss 2 ». Merci Barbara, pour tous nos tournois et pour ton amitié. Merci Quentin et Carlos pour votre bonne humeur et mon surnom « Maman ». Merci Laurent, papi, pour ton soutien et ton humour inlassable. Merci Marlène, d'avoir toujours vu quand ça n'allait pas et pour ta bienveillance et ta gentillesse à mon égard.

Merci à Flora et Leti pour leurs conseils dans le domaine de la recherche. Merci à tous les autres pour avoir égayé mes soirées au bad et m'avoir permis de me détendre : Alex, Mika, Renaud, Philou, Francky, Benoit, Martine, Pauline et tous les autres.

Je souhaite ensuite remercier ma famille. Merci à mes parents, toujours présents, toujours prêts à m'aider et qui ont toujours cru en moi. Merci pour leur soutien et leurs encouragements. Merci Luisa et Luigi, les petits, de m'avoir écoutée parler de ma thèse et pour tous les moments qu'on a partagés ensemble. Merci Luca, d'être mon grand frère, j'espère que tu pourras être là le jour de ma soutenance, tu me manques. Merci à mes grands-parents, ma tante et Lulu qui sont toujours derrière moi.

J'espère que vous serez fiers de moi.

Enfin je souhaite remercier Agus. Merci de partager ta vie avec moi, merci de croire en moi et pour tes encouragements au quotidien. Merci de m'avoir redonné courage et confiance quand j'étais au bout du rouleau. Ta présence et ton amour sont irremplaçables.

Table des matières

| | |
|--------------------------------------------|-----------|
| Avant texte | 10 |
| Liste des figures | 11 |
| Liste des tableaux | 13 |
| Liste des abréviations | 14 |
| Avant-propos..... | 20 |
| Introduction | 22 |
| 1. La mucoviscidose | 23 |
| 1.1. Généralités..... | 23 |
| 1.1.1. Historique | 23 |
| 1.1.2. Épidémiologie | 24 |
| 1.1.3. Diagnostic et dépistage..... | 26 |
| 1.2. Gène et protéine CFTR | 28 |
| 1.2.1. Gène <i>CFTR</i> | 28 |
| 1.2.2. Protéine CFTR | 29 |
| 1.2.3. Localisation de CFTR | 30 |
| 1.2.4. Fonctions de CFTR..... | 31 |
| a) CFTR : canal chlorure | 31 |
| b) CFTR : transporteur..... | 31 |
| c) CFTR : régulateur d'autres canaux | 32 |

| | | |
|-------------|-------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.2.5. | Mutations de CFTR..... | 33 |
| a) | Mutations de classe I | 34 |
| b) | Mutations de classe II | 34 |
| c) | Mutations de classe III | 34 |
| d) | Mutations de classe IV | 35 |
| e) | Mutations de classe V et VI..... | 35 |
| f) | Hétérogénéité phénotypique de la mucoviscidose..... | 35 |
| 1.3. | Manifestations cliniques extra-pulmonaires..... | 36 |
| 1.3.1. | Manifestations digestives | 36 |
| a) | Manifestations gastro-intestinales | 36 |
| b) | Manifestations pancréatiques | 36 |
| c) | Manifestations hépatobiliaires | 37 |
| 1.3.2. | Manifestations génitales..... | 37 |
| 1.3.3. | Manifestations osseuses..... | 37 |
| 1.4. | L'atteinte pulmonaire..... | 38 |
| 1.4.1. | Physiologie pulmonaire..... | 38 |
| a) | Généralités..... | 38 |
| b) | L'épithélium des voies aériennes..... | 39 |
| c) | Le liquide de surface des voies aériennes..... | 43 |
| 1.4.2. | Physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose | 44 |
| 1.4.3. | Les cycles d'infection-inflammation..... | 46 |
| 1.4.4. | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 50 |
| a) | Généralités..... | 50 |
| b) | Facteurs de virulence..... | 51 |
| c) | Infection à <i>P. aeruginosa</i> dans la mucoviscidose..... | 53 |
| 1.4.5. | Analyse transcriptomique | 54 |
| 2. | CHAC1..... | 57 |
| 2.1. | Gène et protéine CHAC1 | 57 |

| | | |
|-------------|-------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.1.1. | Gène CHAC1..... | 57 |
| 2.1.2. | Protéine CHAC1 | 58 |
| 2.1.3. | Régulations de CHAC1 | 59 |
| | a) Régulation transcriptionnelle..... | 59 |
| | b) Régulation de la traduction et post-traductionnelle..... | 60 |
| 2.2. | CHAC1 et stress du réticulum endoplasmique | 61 |
| 2.2.1. | Généralités sur le stress du réticulum endoplasmique | 61 |
| | a) Le réticulum endoplasmique | 61 |
| | b) La voie UPR | 62 |
| 2.2.2. | CHAC1 est un composant de la voie UPR..... | 65 |
| 2.2.3. | Stress du réticulum endoplasmique et mucoviscidose | 67 |
| 2.3. | CHAC1 et apoptose | 70 |
| 2.3.1. | Généralités sur l'apoptose | 70 |
| | a) Voie extrinsèque | 72 |
| | b) Voie intrinsèque..... | 73 |
| 2.3.2. | CHAC1, protéine pro-apoptotique | 75 |
| 2.3.3. | Apoptose et mucoviscidose | 76 |
| 2.4. | CHAC1 et métabolisme du glutathion | 78 |
| 2.4.1. | Le métabolisme du glutathion | 78 |
| | a) Le glutathion | 78 |
| | b) Le cycle <i>γ-glutamyl</i> | 79 |
| | c) Fonctions et dérégulations du glutathion | 81 |
| 2.4.2. | CHAC1 dégrade le glutathion..... | 83 |
| 2.4.3. | Mucoviscidose et glutathion..... | 85 |
| 2.5. | CHAC1 et pathologies..... | 86 |

| | |
|------------------------------------|------------|
| 2.5.1. CHAC1 et cancer | 87 |
| 2.5.2. CHAC1 et infection..... | 89 |
| 2.5.3. Autres | 91 |
| Objectifs | 93 |
| Résultats..... | 95 |
| 1. Résumé de l'article..... | 96 |
| 1.1. Contexte de l'étude..... | 96 |
| 1.2. Résultats | 97 |
| 1.3. Conclusion | 98 |
| 2. Article..... | 100 |
| Discussion..... | 150 |
| Références bibliographiques..... | 160 |
| Annexe | 181 |

Avant texte

Liste des figures

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Prévalence estimée de la mucoviscidose pour 100 000 habitants à travers le monde. | 25 |
| Figure 2 : Différentes étapes du dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France. | 27 |
| Figure 3: Du gène à l'ARNm <i>CFTR</i> | 28 |
| Figure 4 : Organisation structurale de la protéine CFTR. | 30 |
| Figure 5 : Immunomarquage de la protéine CFTR. | 31 |
| Figure 6 : Classification des conséquences moléculaires des mutations du gène <i>CFTR</i> | 34 |
| Figure 7 : Anatomie de l'appareil respiratoire. | 38 |
| Figure 8 : Schéma représentant la répartition des différents types cellulaires le long de l'épithélium des voies aériennes. | 39 |
| Figure 9 : Les différents types de cellules épithéliales des voies aériennes. | 41 |
| Figure 10 : L'épithélium alvéolaire. | 42 |
| Figure 11 : Liquide de surface des voies aériennes. | 43 |
| Figure 12 : Représentation des bactéries cliniquement importantes dans la mucoviscidose par classes d'âges en France..... | 44 |
| Figure 13 : Schéma récapitulatif des conséquences des mutations du gène <i>CFTR</i> au niveau des voies aériennes et stratégies thérapeutiques pour la prise en charge de l'atteinte respiratoire. | 45 |
| Figure 14 : Mécanismes de destruction bactérienne de l'immunité innée dans les voies aériennes d'individus sains et de patients CF. | 49 |
| Figure 15 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 50 |
| Figure 16 : Facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> | 51 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 17 : Profils d'expression des transcriptomes des cellules non-CF et CF au cours de l'infection à <i>P. aeruginosa</i> | 55 |
| Figure 18 : Du gène à l'ARNm <i>CHAC1</i> | 57 |
| Figure 19 : Immunofluorescence de la protéine CHAC1. | 58 |
| Figure 20 : Localisation tissulaire de CHAC1 chez l'homme. | 59 |
| Figure 21 : Représentation schématique du réticulum endoplasmique. | 61 |
| Figure 22 : Description schématique de la voie UPR du stress du RE. | 65 |
| Figure 23 : CHAC1 dans la voie UPR initiée par PERK. | 67 |
| Figure 24 : UPR et inflammation. | 69 |
| Figure 25 : Changements morphologiques et biochimiques lors de l'apoptose d'une cellule. | 71 |
| Figure 26 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. | 74 |
| Figure 27 : Structure du glutathion. | 78 |
| Figure 28 : Cycle γ -glutamyl. | 80 |
| Figure 29 : Glutathion et homéostasie redox. | 81 |
| Figure 30 : Structure de la protéine CHAC1. | 83 |
| Figure 31 : CHAC1 : fonctions et pathologies. | 92 |
| Figure 32 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus, des perspectives et hypothèses du projet. | 159 |

Liste des tableaux

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1 : Tableau récapitulatif des 5 variants de l'ARNm de <i>CHAC1</i> et des 5 isoformes protéiques correspondantes. | 58 |
| Tableau 2 : Dérégulation de la biosynthèse du glutathion et pathologies. | 82 |
| Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différentes publications concernant CHAC1 et cancer. | 89 |
| Tableau 4 : CHAC1 et infection. | 90 |

Liste des abréviations

A

| | |
|---------|---------------------------------------------------|
| AARE | <i>amino acid response element</i> |
| ABC | <i>ATP-binding cassette</i> |
| ABCC7 | <i>ATP-binding cassette sub-family C member 7</i> |
| ACM | <i>ATF/CRE modifier element</i> |
| AIF | <i>apoptosis inducing factor</i> |
| AKT | <i>PKB, protein kinase B</i> |
| AMPC | adénosine monophosphate cyclique |
| AP-1 | <i>activated protein 1</i> |
| APAF1 | <i>apoptotic peptidase activating factor 1</i> |
| AprA | protéase alcaline |
| ARNm | acide ribonucléique messenger |
| ATF | <i>activating transcription factor</i> |
| ATF/CRE | <i>ATF/cAMP response element</i> |
| ATP | adénosine-5'-triphosphate |

B

| | |
|-----------------|---------------------------------------|
| BiP | <i>binding immunoglobulin protein</i> |
| Br ⁻ | ion bromure |

C

| | |
|------|---------------------------|
| CCL2 | <i>chemokine ligand 2</i> |
| CF | <i>cystic fibrosis</i> |

| | |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CFBD | <i>cystic fibrosis-related bone disease</i> |
| CFTR | <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> |
| CHAC1 | <i>cation transport regulator-like protein 1</i> ou <i>ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1</i> |
| CHOP | <i>C/EBP homologous protein</i> |
| Cl ⁻ | ion chlorure |
| CO ₂ | dioxyde de carbone |
| CRCM | centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose |
| CREB | <i>cAMP response element binding protein</i> |

D

| | |
|------|-------------------------|
| DcR3 | <i>decoy receptor 3</i> |
| DMSO | diméthylsulfoxyde |
| DTT | dithiothréitol |

E

| | |
|----------------|----------------------------------------------------------------------|
| ECFS | <i>European Cystic Fibrosis Society</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| eIF2 α | <i>eukaryotic translation initiation factor 2α</i> |
| ENaC | <i>epithelial Na⁺ channel</i> |
| ERAD | <i>endoplasmic reticulum-associated degradation</i> |
| ERK | <i>extracellular signal-regulated kinase</i> |
| ESHG | <i>European Society of Human Genetics</i> |
| Exo | exoenzyme |

F

| | |
|----------------|--------------|
| F ⁻ | ion fluorure |
|----------------|--------------|

FADD *Fas associated death domain*

G

GADD34 *growth arrest and DNA damage-inducible protein*

GCS γ -glutamyl-cystéine synthase

γ -GCT γ -glutamylcyclotransférase

GGT γ -glutamyl-transférase

GRP78 *glucose-regulated protein 78*

GS glutathion synthétase

GSH forme réduite du glutathion

GSSG forme oxydée du glutathion

H

HAEC *human aortic endothelial cells*

hAECBs *human airway epithelial cells isolated from bronchi*

HEK 293 *human embryonic kidney cells 293*

HCO_3^- bicarbonate

H. pylori *Helicobacter pylori*

HSPA5 *heat shock protein A5*

I

I^- ion iodure

IAP *inhibitor of apoptosis*

IKK *I κ B kinase*

IL interleukine

IPE insuffisance pancréatique exocrine

IRE1 α *inositol-requiring enzyme 1 α*

K

K⁺ ion potassium

kb kilobase

kDa kiloDalton

L

LB Luria-Bertani

LPS lipopolysaccharide

LTc lymphocyte T cytotoxique

M

MAPK *mitogen-activated protein kinase*

MBL2 *mannose binding lectin 2*

MOI *multiplicity of infection*

N

Na⁺ ion sodium

NBD *nucleotide binding domain*

Neuro2a lignée cellulaire de neuroblastomes murins

NF-κB *nuclear factor-kappa B*

NO₃⁻ nitrate

O

O₂ dioxygène

ORCC *outwardly rectifying chloride channel*

ox-PAPC *oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-3-glycero-phosphorylcholine*

P

| | |
|----------------------|-----------------------------------------------|
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| PAMPs | <i>pathogen associated molecular patterns</i> |
| PARP | poly(ADP-ribose) polymérase |
| PBS | <i>phosphate-buffered saline</i> |
| PERK | <i>PKR-like endoplasmic reticulum kinase</i> |
| PGE2 | prostaglandine E2 |
| PK | protéine kinase |
| pS | pico Siemens |

R

| | |
|---------|---------------------------------------|
| RE | réticulum endoplasmique |
| rhDNase | DNase recombinante humaine |
| RIDD | <i>regulated IRE1-dependent decay</i> |
| RNase | endoribonucléase |
| ROS | espèces réactives de l'oxygène |
| RT | <i>reverse transcription</i> |

S

| | |
|-----------------------|-------------------------------------|
| S1P | <i>site 1 protease</i> |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| siRNA | <i>small interference RNA</i> |
| <i>S. maltophilia</i> | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> |
| SST2 | système de sécrétion de type II |
| SST3 | système de sécrétion de type III |

T

| | |
|----------------|---------------------------------------------------------------------|
| Tg | thapsigargine |
| TGF- β 1 | <i>transforming growth factor beta 1</i> |
| TIR | trypsin immunoréactive |
| TLR | <i>toll-like receptor</i> |
| TM | tunicamycine |
| TMB | 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine |
| TMD | <i>transmembrane domain</i> |
| TNF- α | <i>tumor necrosis factor α</i> |
| TNFRSF6B | <i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 6B</i> |
| TP53 | <i>tumor protein 53</i> |
| TRAF2 | <i>TNF receptor-associated factor 2</i> |
| TRIB3 | <i>tribbles homolog 3</i> |
| TUNEL | <i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i> |

U

| | |
|-----|----------------------------------|
| UPR | <i>unfolded protein response</i> |
|-----|----------------------------------|

V

| | |
|------|----------------------------------------|
| VEMS | volume expiratoire maximal par seconde |
|------|----------------------------------------|

X

| | |
|------|--------------------------------|
| XBP1 | <i>X-box binding protein 1</i> |
|------|--------------------------------|

Avant-propos

La mucoviscidose est la maladie génétique la plus fréquente des maladies rares à transmission autosomique récessive dans les populations d'origine caucasienne. Elle touche plus de 70 000 malades dans le monde dont presque 7 000 en France. Depuis la découverte du gène *CFTR* responsable de la mucoviscidose en 1989, d'importants progrès ont été réalisés en recherche fondamentale et clinique, permettant une meilleure compréhension de la maladie, une amélioration de la qualité de vie des patients et l'orientation des recherches vers une thérapeutique curative.

Les conséquences physiopathologiques des mutations du gène *CFTR* sont nombreuses. L'inflammation et l'infection broncho-pulmonaire chroniques sont les causes principales de morbidité et de mortalité des patients atteints de mucoviscidose. L'un des pathogènes majeurs dans la mucoviscidose est *Pseudomonas aeruginosa* qui colonise les voies aériennes des patients de l'enfance jusqu'à l'âge adulte sans éradication malgré les cures d'antibiothérapies administrées aux patients atteints de mucoviscidose.

Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié le rôle de CHAC1, dont l'expression génique est modulée en réponse à l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans les cellules épithéliales bronchiques de patients atteints de mucoviscidose par rapport à des cellules de donneurs sains. Nous avons dans un premier temps cherché à comprendre le rôle physiologique de cette protéine sur la réponse inflammatoire dans un contexte infectieux. Puis dans un second temps, nous nous sommes intéressés à étudier les fonctions connues de CHAC1 dans des modèles de cellules épithéliales bronchiques.

Afin de placer les travaux présentés dans ce manuscrit dans un contexte général et scientifique, nous aborderons dans l'introduction, les connaissances actuelles sur i) la mucoviscidose, la protéine responsable de la maladie, la physiopathologie et les conséquences sur l'épithélium des voies respiratoires, ii) CHAC1, revue bibliographique des connaissances concernant cette protéine. Enfin, les résultats, les conclusions et les perspectives de ces travaux seront développés.

Introduction

1. La mucoviscidose

1.1. Généralités

1.1.1. Historique

La mucoviscidose a été décrite scientifiquement comme une maladie pour la première fois en 1936 par le pédiatre suisse Guido Fanconi (Fanconi 1936, Durieu *et al.* 1999) mais était déjà connue depuis longtemps. Au Moyen Âge, le sort funeste du nouveau-né dont la mère remarquait le « baiser salé » était connu. En 1606, le médecin espagnol Alonso y de los Ruyzes de Fonteca rapporte que « les doigts passés sur le front des enfants ensorcelés ont un goût salé » (Alonso y de los Ruyzes de Fonteca 1606). Rochholz dans son almanach de 1857 écrit « L'enfant mourra bientôt dont le front embrassé est salé » (Rochholz 1857).

Selon Busch, une des premières descriptions médicales des lésions pancréatiques rencontrées dans la mucoviscidose pourrait dater de 1595 (Busch 1990). En effet, un rapport d'autopsie fait par le professeur Pieter Pauw aux Pays-Bas décrit une patiente âgée de 11 ans supposée ensorcelée et présentant un pancréas élargi, dur et blanc. En 1905, Landsteiner décrit une atteinte digestive présente chez certains enfants atteints de mucoviscidose, l'iléus méconial (Landsteiner 1905).

Au début du XX^{ème} siècle apparaissent les premières observations associant maladie pulmonaire, diarrhée et anomalie pancréatique grâce à plusieurs cas dans une famille (Garrod et Hurley 1912).

En 1936, Fanconi décrit la maladie comme une maladie cœliaque sous le nom de « fibrose kystique du pancréas et bronchectasie ». Mais la mucoviscidose ne sera considérée comme une maladie à part entière qu'en 1938 par la pédiatre américaine Dorothy Hansine Andersen qui publie un article intitulé « Fibrose kystique du pancréas et ses relations avec la maladie cœliaque ». Elle y décrit les caractéristiques cliniques de la mucoviscidose, notamment l'obstruction intestinale néonatale, les complications respiratoires et digestives ainsi que les lésions histologiques spécifiques du pancréas (Andersen 1938).

Le terme mucoviscidosis créé à partir des termes « mucus » et « visqueux » fût utilisé pour la première fois en 1943 par le docteur Sydney Farber (Farber 1943) afin de corriger la dénomination employée par Dorothy Hansine Andersen, centrée sur le pancréas.

Le caractère héréditaire et le mode de transmission récessif furent suggérés en 1945 par Andersen et Hodges (Andersen et Hodges 1946).

En 1953, le docteur Paul Di Sant' Agnese découvre et décrit les anomalies électrolytiques dans la sueur des patients atteints de mucoviscidose, notamment une élévation importante d'ions chlorure (Cl⁻) et sodium (Na⁺) (Di Sant'Agnese *et al.* 1953). Cette découverte permet alors d'envisager un diagnostic plus spécifique de la maladie, le test de la sueur.

En 1981, Mickael Knowles et ses collaborateurs découvrent que le potentiel électrique au niveau de la muqueuse nasale des patients atteints de mucoviscidose est plus électronégatif que chez les sujets sains, ce qu'ils expliquent par une réabsorption massive de sodium entraînant une déshydratation à la surface de l'épithélium (Knowles *et al.* 1981). Cette découverte fait le lien physiologique entre les poumons, le pancréas et les glandes sudoripares.

En 1989, le gène impliqué dans la mucoviscidose est isolé et séquencé par les équipes de Lap-Chee Tsui et Riordan (Kerem *et al.* 1989, Riordan *et al.* 1989, Rommens *et al.* 1989). L'anomalie génétique de la maladie concerne le gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) localisé sur le chromosome 7 et codant pour une protéine transmembranaire du même nom. La fonction de canal chlorure de la protéine CFTR n'est déterminée que plus tard dans les années 90 (Anderson *et al.* 1991).

La découverte de l'anomalie génétique a permis par la suite d'ajouter le génotypage au protocole diagnostic et d'envisager la thérapie génique.

1.1.2. Épidémiologie

La mucoviscidose ou fibrose kystique (*cystic fibrosis* en anglais : CF) est la maladie génétique la plus fréquente des maladies rares à transmission autosomale récessive rencontrée dans les populations d'origine caucasienne.

Le registre de la *European Cystic Fibrosis Society* (ECFS) de 2015 estime qu'il y a plus de 70 000 malades dans le monde dont 42 054 recensés en Europe et 6 757 en France (registre français de la mucoviscidose de 2016) qui est le second pays d'Europe, après le Royaume-Uni, qui recense le plus de patients atteints de mucoviscidose (Figure 1).

L'incidence de la mucoviscidose est très variable selon les pays et les origines ethniques. Aux États-Unis, l'incidence varie entre un nouveau-né sur 3 000 naissances chez les américains d'origine caucasienne, un sur 4 000-10 000 chez les latino-américains et un sur 15 000-20 000 chez les américains d'origine africaine alors qu'elle est d'un sur 350 000 au Japon (O'Sullivan et Freedman 2009).

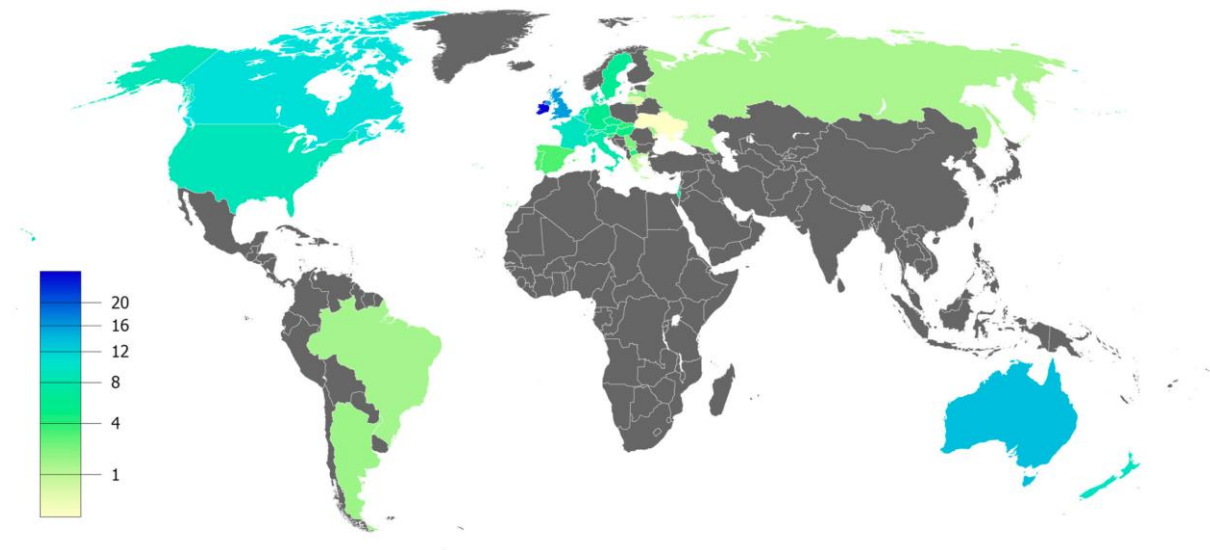


Figure 1 : Prévalence estimée de la mucoviscidose pour 100 000 habitants à travers le monde. (D'après Lopes-Pacheco 2016).

Le sexe-ratio est proche de 1, les hommes et les femmes sont atteints avec la même fréquence bien que la maladie soit plus sévère chez les femmes (Stephenson *et al.* 2017).

L'espérance de vie des patients est passée de 5 ans dans les années 60 à plus de 50 ans en moyenne pour les patients qui naissent aujourd'hui grâce aux progrès concernant l'amélioration des traitements et de la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose.

1.1.3. Diagnostic et dépistage

Les mutations du gène *CFTR* responsables de la mucoviscidose sont transmises de façon autosomique récessive.

Le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose a été instauré en 2002 en France (Figure 2). Il consiste en un test appelé test de Guthrie effectué chez les nourrissons permettant une prise en charge précoce de la maladie (Farriaux *et al.* 2003). Le dépistage néonatal repose sur une technique en deux temps. Tout d'abord un dosage de la trypsine immunoréactive (TIR) est réalisé dans le sang des nouveau-nés prélevé au 3^{ème} jour de vie. La TIR est une enzyme pancréatique normalement totalement absente du sang. Un dosage trop élevé de TIR (TIR > 60 µg/L) reflète donc une obstruction des voies pancréatiques. Ce dosage permet de dépister environ 95 % des nouveau-nés atteints de mucoviscidose. Mais ce n'est pas un dosage spécifique de la mucoviscidose. Ainsi, si le dosage est positif, il doit être couplé à une analyse moléculaire des 29 mutations du gène *CFTR* les plus fréquemment retrouvées dans la population.

Trois cas de figure peuvent alors se présenter (registre français de la mucoviscidose 2016) :

- deux mutations sont identifiées. Une confirmation du diagnostic est alors réalisée dans un centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose (CRCM), reposant sur l'évaluation clinique du nouveau-né et un test de la sueur positif. Un traitement et un suivi sont alors mis en place.
- une seule mutation est identifiée (le risque qu'une deuxième mutation ne soit pas identifiée est de 10 %). Le test de la sueur doit être réalisé dans un centre spécialisé. Si le test est positif, le nouveau-né sera pris en charge par un CRCM. Si le test se révèle négatif, l'information sur l'hétérozygotie de l'enfant sera donnée aux parents lors d'une consultation de conseil génétique.
- aucune mutation n'est retrouvée et la TIR est très élevée. Un deuxième dosage de contrôle de la TIR sera réalisé à 21 jours de vie. La persistance d'une TIR élevée conduira à une consultation dans un centre spécialisé pour la réalisation d'un test de la sueur.

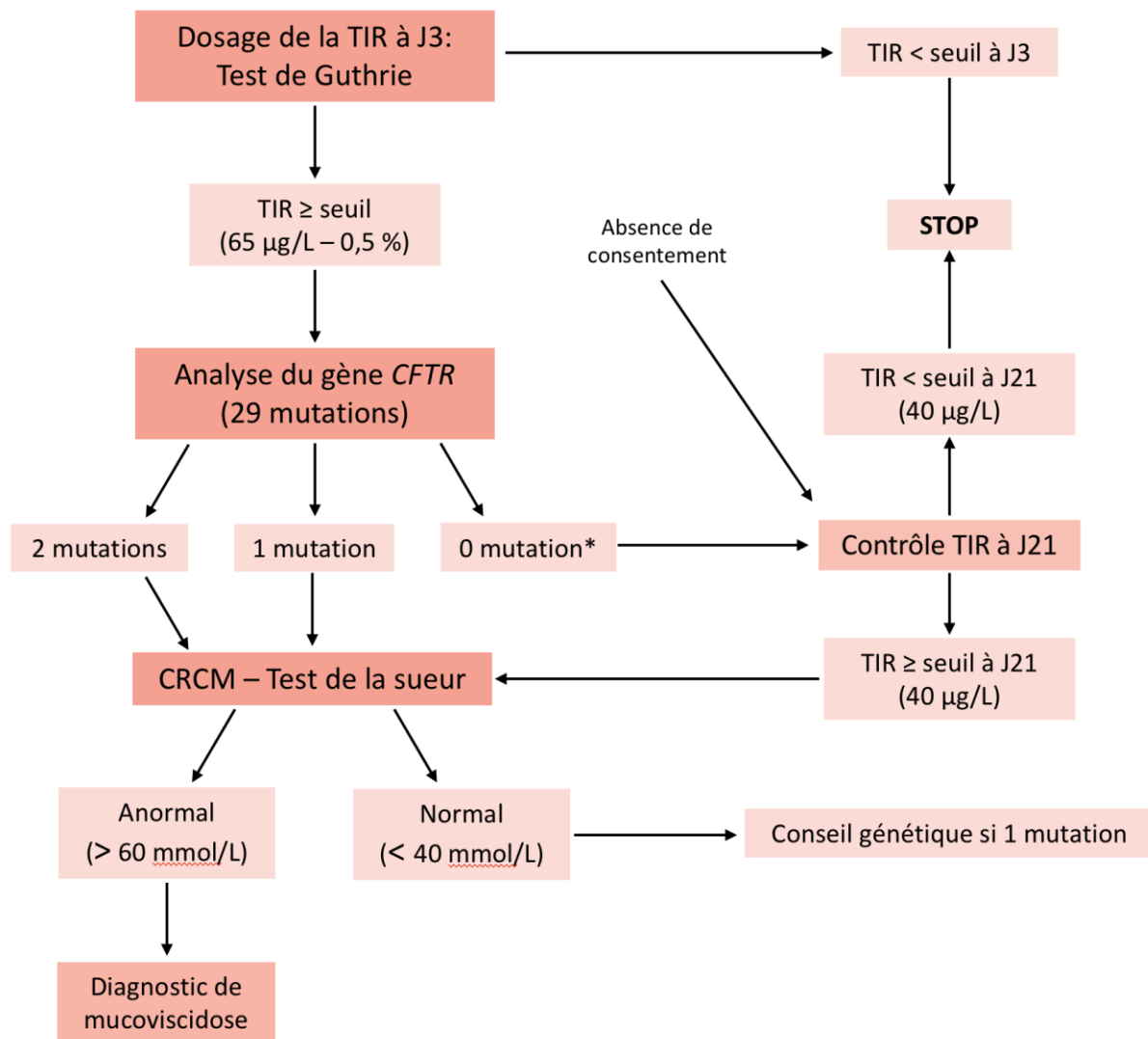


Figure 2 : Différentes étapes du dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France.
 TIR : trypsine immunoréactive, * si la TIR à J3 est supérieure à 100 µg/L.
 (D'après Munck et Roussey 2008).

Le test de la sueur est le test diagnostique de la mucoviscidose. Proposé dès 1953 par Di Sant'Agnesse, il consiste à doser la quantité d'ions Cl^- dans la sueur des patients (Di Sant'Agnesse *et al.* 1953). La sueur des patients CF est salée en raison d'une augmentation d'ions Cl^- , Na^+ et potassium (K^+) due à la déficience de CFTR entraînant une diminution de l'absorption des ions Cl^- par les cellules des glandes sudoripares. Le test de la sueur est pathologique lorsque la concentration d'ions Cl^- est supérieure à 60 mmol/L et douteux lorsqu'elle est entre 40 et 60 mmol/L et nécessite donc un nouveau test de la sueur et une recherche plus large de mutations (Sermet-Gaudelus *et al.* 2010).

Le dépistage prénatal ou préimplantatoire de la mucoviscidose est proposé pour les couples à risque de donner naissance à un enfant atteint de mucoviscidose. Si l'enfant est atteint de la maladie, une interruption de grossesse peut être envisagée.

1.2. Gène et protéine CFTR

1.2.1. Gène *CFTR*

Le gène *CFTR* est localisé dans la région q31.2 du bras long du chromosome 7. Ce gène est composé d'environ 190 kilobases (kb) réparties en 27 exons à l'origine de la formation d'un ARNm (acide ribonucléique messager) de 6,5 kb (Kerem *et al.* 1989, Ellsworth *et al.* 2000) (Figure 3).

Les mutations du gène *CFTR* sont responsables de la mucoviscidose.

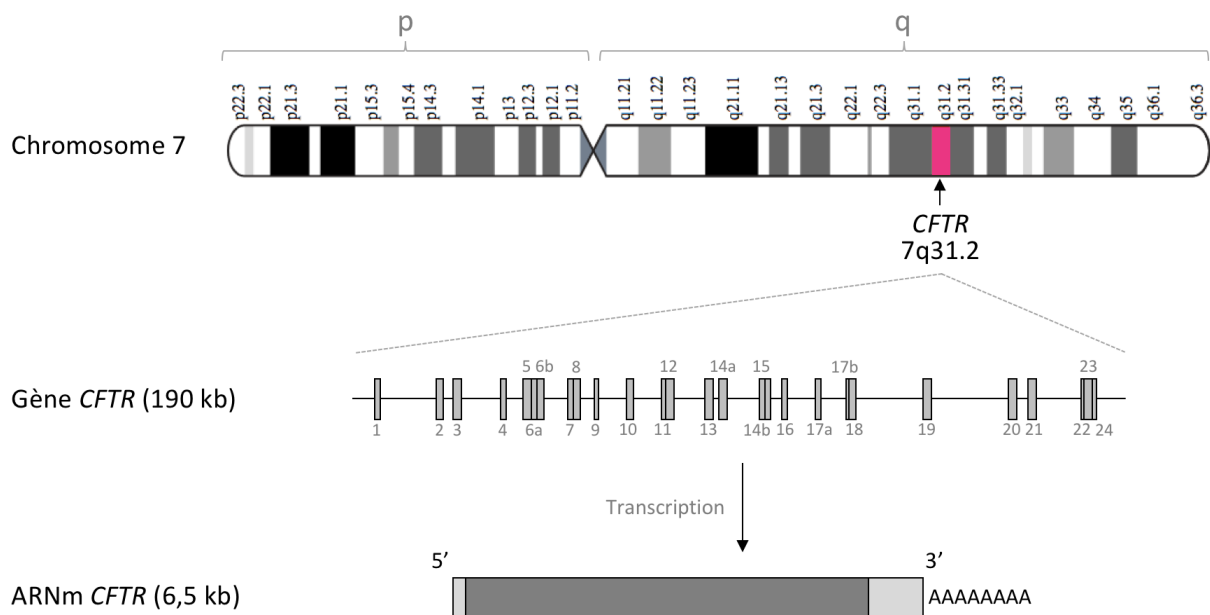


Figure 3: Du gène à l'ARNm *CFTR*.

De haut en bas : Localisation du gène *CFTR* dans la région q31.2 sur le chromosome 7 humain, représentation du gène *CFTR* à l'échelle faisant apparaître les exons (rectangles gris), ARNm *CFTR*. (D'après Rowntree et Harris 2003).

1.2.2. Protéine CFTR

Le gène *CFTR* code pour une protéine du même nom. CFTR est une glycoprotéine transmembranaire constituée de 1 480 acides aminés avec une masse moléculaire de 168 kiloDalton (kDa) (Riordan *et al.* 1989, Rommens *et al.* 1989). La protéine CFTR appartient à la famille des transporteurs membranaires ABC (*ATP-binding cassette*), c'est pourquoi elle porte également le nom de ABCC7 pour *ATP-binding cassette sub-family C member 7*. Cette famille est l'une des plus importantes superfamilles de protéines. La caractéristique prédominante de ces protéines membranaires est leur capacité à lier et hydrolyser l'ATP (adénosine-5'-triphosphate) *via* deux sites spécifiques, les domaines NBD (*nucleotide binding domain*). En utilisant l'ATP, ces transporteurs sont capables de faire transiter, au travers des membranes cellulaires, une grande variété de substances (acides aminés, peptides, lipides, protéines, ions, toxines, etc.). Les transporteurs ABC présentent également deux domaines transmembranaires appelés TMD (*transmembrane domains*).

La protéine CFTR contient (Figure 4) :

- deux domaines transmembranaires hydrophobes TMD1 et TMD2 comprenant chacun six hélices α . Ces domaines permettent la formation du pore du canal.
- deux domaines hydrophiles de liaison aux nucléotides NBD1 et NBD2. Ces domaines sont formés de feuillets β entourés d'hélices α et contiennent des séquences consensus de liaison à l'ATP participant à la régulation des mécanismes ATP-dépendants d'ouverture et de fermeture du canal.
- un large domaine hydrophile régulateur R cytoplasmique qui relie les deux séquences répétées TMD-NBD. Ce domaine, spécifique de CFTR, contient de nombreux résidus chargés et plusieurs sérines phosphorylables par les protéines kinases A (PKA) et C (PKC) (Riordan *et al.* 1989).

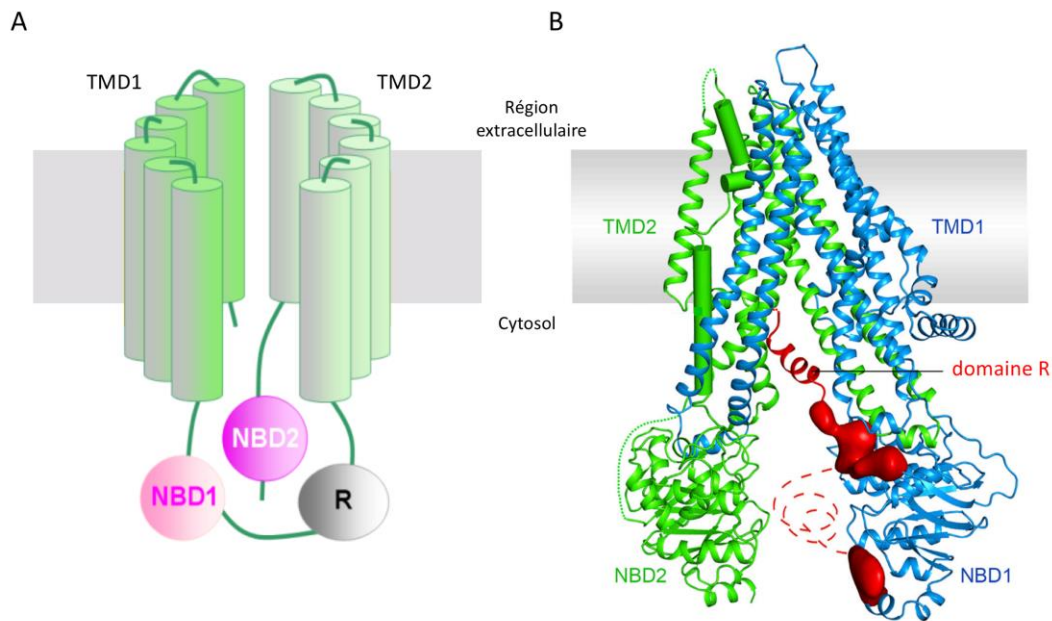


Figure 4 : Organisation structurelle de la protéine CFTR.

(A) Schéma montrant l'organisation transmembranaire des différents domaines de la protéine CFTR : deux domaines transmembranaires TMD1 et TMD2, deux domaines de liaison aux nucléotides NBD1 et NBD2 et un domaine régulateur R.

(B) Structure moléculaire de CFTR humain déterminée dans la conformation déphosphorylée, sans ATP. (D'après Liu et al. 2017).

1.2.3. Localisation de CFTR

La protéine CFTR est exprimée dans de nombreux organes et dans divers types cellulaires. CFTR est principalement localisée à la membrane apicale des cellules épithéliales des organes possédant des glandes exocrines : poumons, pancréas, foie, intestins, peau et appareils génitaux (Riordan *et al.* 1989, Crawford *et al.* 1991). L'expression de CFTR varie selon les tissus. Elle est très exprimée dans les glandes sudoripares et pancréatiques mais faiblement exprimée au niveau de l'épithélium bronchique et son expression diminue distalement dans le poumon (CFTR est plus exprimée dans l'épithélium nasal et bronchique que bronchiolaire) (Kreda *et al.* 2005). Au niveau pulmonaire, la protéine CFTR est majoritairement localisée au niveau de l'épithélium de surface des voies aériennes et essentiellement au niveau de la membrane apicale des cellules ciliées (Figure 5) et des glandes sous-muqueuses (Jacquot *et al.* 1993).

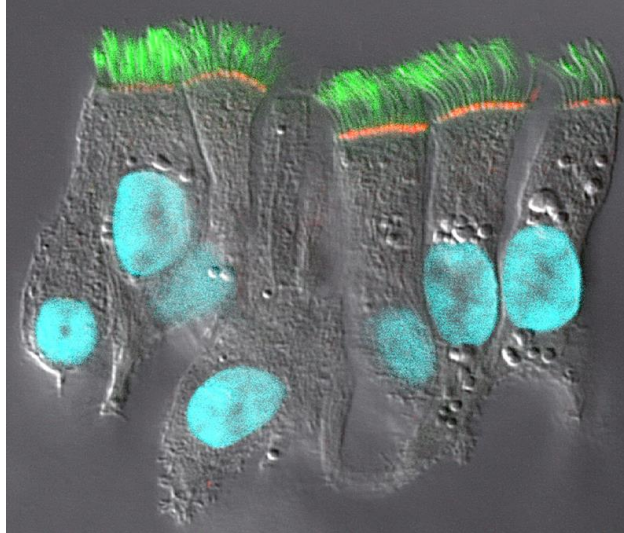


Figure 5 : Immunomarquage de la protéine CFTR.
 CFTR est présent au niveau apical de la membrane des cellules ciliées bronchiques (CFTR en rouge, cils en vert (tubuline beta) et noyaux en bleu (DAPI)).
 (D'après Kreda et al. 2005).

1.2.4. Fonctions de CFTR

a) CFTR : canal chlorure

CFTR a été identifiée en 1991 comme étant un canal chlorure (Anderson *et al.* 1991). Il permet le passage d'ions Cl^- de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur. Le canal CFTR est spécifique aux anions et sa séquence de perméabilité est la suivante : $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$ (Anderson *et al.* 1991). La même année, Anderson et ses collaborateurs démontrent que CFTR est un canal Cl^- sensible à l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) et que l'ATP est requise pour ouvrir ce canal phosphorylé par la PKA (Anderson *et al.* 1991). La conductance du canal CFTR a été évaluée entre 6 et 10 pS (pico Siemens) selon les espèces, les concentrations ioniques et la température (Sheppard et Welsh 1999).

b) CFTR : transporteur

Le canal CFTR est perméable à d'autres molécules, notamment aux anions polyatomiques tels que le nitrate (NO_3^-) ou le bicarbonate (HCO_3^-) (Linsdell *et al.* 1997).

Le canal CFTR permet également le transport de glutathion réduit (GSH) ou oxydé (GSSG) (Linsdell et Hanrahan 1998). Le glutathion est l'antioxydant extracellulaire le plus important

retrouvé au niveau des poumons. Ce tripeptide ubiquitaire est retrouvé dans toutes les cellules eucaryotes et protège l'organisme des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le GSH est synthétisé dans le cytoplasme où les concentrations normales sont de 1 à 10 mM. Il est retrouvé à des fortes concentrations (400 μ M) dans le liquide de surface des voies respiratoires de personnes saines, soit environ 50 fois les concentrations plasmatiques de GSH ou 100 fois les quantités retrouvées dans les fluides extracellulaires d'autres tissus (Linsdell et Hanrahan 1998). De plus, il a été montré que les concentrations de GSH étaient diminuées dans le liquide de surface des voies respiratoires des patients CF (Roum *et al.* 1993). Ces observations concernant le GSH et son implication potentielle dans l'exacerbation du stress oxydant qui résulte de l'inflammation chronique des poumons des patients CF, ont mené à la démonstration que CFTR est un transporteur de glutathion, autant sa forme réduite qu'oxydée (Linsdell et Hanrahan 1998). CFTR présente tout de même une perméabilité faible pour l'anion divalent GSSG par rapport au GSH et aux autres anions monovalents. Kogan et ses collaborateurs démontrent en 2003 que le flux de GSH est une propriété intrinsèque de CFTR et que les anomalies de transport du GSH seraient directement liées à l'anomalie génétique de CFTR (Kogan *et al.* 2003).

c) CFTR : régulateur d'autres canaux

La protéine CFTR régule d'autres canaux tels que le canal sodique ENaC (*epithelial Na⁺ channel*) ou le canal Cl⁻ dépendant de l'AMPc ORCC (*outwardly rectifying chloride channel*).

ENaC est régulé négativement par CFTR (Mall *et al.* 1998). Avant même l'identification de CFTR, une hyperabsorption de Na⁺ avait été observée dans les cellules épithéliales CF (Boucher *et al.* 1986). Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'absence ou la déficience de la protéine CFTR entraîne une levée de l'inhibition du canal ENaC induisant ainsi un influx accru de Na⁺ dans les cellules, principal responsable de la déshydratation du liquide de surface des voies aériennes.

La protéine CFTR régule positivement le canal ORCC (Gabriel *et al.* 1993). La présence de protéines CFTR fonctionnelles est nécessaire pour l'activation de ORCC par la PKA ou l'ATP.

1.2.5. Mutations de CFTR

À ce jour, plus de 2 000 mutations du gène *CFTR* sont recensées dans la base de données CFTR1 ou *Cystic Fibrosis Mutation Database* (<http://www.sickkids.ca/search/search.aspx>). La plupart sont des mutations ponctuelles avec des conséquences variables sur la protéine CFTR. Des études de structure et de fonction ont été réalisées sur seulement 312 mutations qui ont pu être validées et qualifiées de *CF causing* (base de données CFTR2 : <https://www.cftr2.org/>).

Il existe deux sortes de classifications des mutations de *CFTR*.

La plus récente classe les mutations selon leurs conséquences cliniques chez le patient. Elle a été établie en 2007 au cours de la Conférence Consensus organisée par l'ECFS et en partenariat avec l'ESHG (*European Society of Human Genetics*) et l'*EuroGentest Network of Excellence* (Castellani *et al.* 2008). Cette classification répartit les mutations de *CFTR* en quatre groupes :

- groupe A : mutations qui engendrent une forme classique de la mucoviscidose.
- groupe B : mutations qui engendrent une forme non classique de la mucoviscidose (associée aux troubles liés à CFTR).
- groupe C : mutations qui n'ont pas de conséquences cliniques connues.
- groupe D : mutations qui présentent une pertinence clinique inconnue ou incertaine (Fanen *et al.* 2014).

Néanmoins la classification des mutations de *CFTR* la plus utilisée reste celle qui les classe selon les conséquences fonctionnelles qu'elles engendrent sur la protéine CFTR (Figure 6). Cette classification a été initiée en 1993 et comportait quatre classes de mutations de I à IV (Welsh et Smith 1993). Une cinquième classe a ensuite été rajoutée à cette classification en 1995 (Kerem et Kerem 1995) puis une sixième en 1999 (Haardt *et al.* 1999). Les mutations de classe I à III sont associées à des phénotypes plus sévères de la mucoviscidose alors que les mutations de classe IV à VI sont associées à des phénotypes plus modérés de la maladie. Il a été proposé en 2001 de regrouper les classes V et VI en une seule classe (Welsh *et al.* 2001) mais cela reste controversé dans la littérature (Fanen *et al.* 2014, Elborn 2016). Il a également été récemment proposé la création d'une nouvelle classe de mutation pour les mutations de *CFTR* qui sont irrécupérables pharmacologiquement (De Boeck et Amaral 2016).

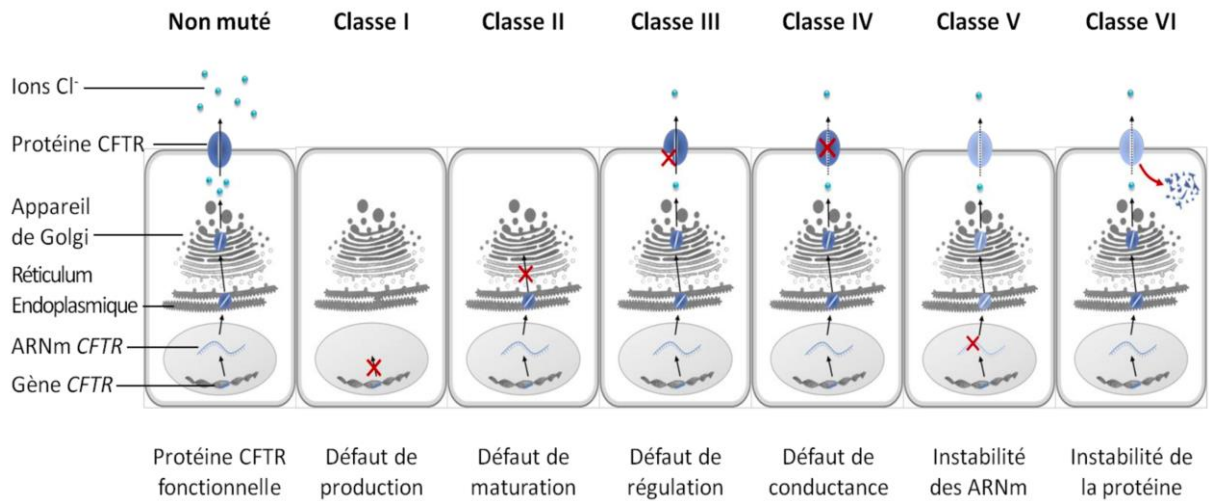


Figure 6 : Classification des conséquences moléculaires des mutations du gène *CFTR*. (D'après Wilschanski et Durie 2007).

a) Mutations de classe I

Les mutations de classe I entraînent un défaut de production d'une protéine CFTR fonctionnelle qui est alors partiellement ou totalement absente. La présence d'un codon stop conduit à la production d'un ARNm instable ou d'une courte protéine tronquée qui est non fonctionnelle et rapidement dégradée. La mutation la plus fréquente de cette classe est la mutation G542X.

b) Mutations de classe II

Les mutations de classe II sont associées à un défaut de maturation en raison d'un mauvais repliement de la protéine CFTR. La protéine mal conformée est retenue dans le réticulum endoplasmique (RE) puis dirigée vers le cytoplasme où elle sera dégradée par le protéasome. La mutation la plus fréquente de cette classe est la mutation F508del, qui correspond à la délétion d'une phénylalanine en position 508 de la protéine CFTR. Les patients français sont homozygotes à 42 % et hétérozygotes à 41,5 % pour la mutation F508del (registre français de la mucoviscidose 2016), ainsi 83,5 % des patients français sont porteurs d'au moins une copie de cette mutation.

c) Mutations de classe III

Les mutations de classe III ou *gating mutations* altèrent la régulation du canal chlorure CFTR. Ce sont des mutations faux-sens qui produisent une protéine efficacement insérée dans la membrane plasmique. La protéine produite est en quantité suffisante mais ses domaines de

liaison à l'ATP (NBD1 et 2) sont altérés, ce qui affecte la probabilité d'ouverture du canal. La mutation G551D est une mutation de classe III.

d) Mutations de classe IV

Les mutations de classe IV altèrent la conductance du canal chlorure CFTR. La protéine CFTR est correctement synthétisée et adressée à la membrane plasmique mais la conductance du canal est réduite. La mutation R117H est la mutation de classe IV la mieux caractérisée.

e) Mutations de classe V et VI

Les mutations de classe V et VI altèrent la quantité totale de protéine CFTR présente à la membrane plasmique du fait d'une instabilité de l'ARNm qui code pour la protéine CFTR (classe V) ou de la protéine CFTR directement (classe VI).

Cette classification simplifiée peut être parfois incorrecte. Certaines mutations pourraient être multi-classes. C'est par exemple le cas de la mutation F508del qui présente, en plus d'un défaut de production, une probabilité d'ouverture et une stabilité réduites (Veit *et al.* 2016).

f) Hétérogénéité phénotypique de la mucoviscidose

Bien que la mucoviscidose soit une maladie monogénique, le type de mutation de *CFTR* peut influencer la sévérité de la maladie. Cependant, les profils cliniques de patients porteurs des mêmes mutations peuvent être très différents (Cutting 2005). Par ailleurs, des observations sur des jumeaux présentant des phénotypes cliniques différents indiquent que l'environnement n'est pas le seul facteur jouant sur le phénotype de la maladie (Vanscoy *et al.* 2007). En effet, il est maintenant reconnu que des variants génétiques ou polymorphismes, les « gènes modificateurs », situés en dehors du locus de *CFTR*, influencent l'expression phénotypique de la mucoviscidose (Corvol *et al.* 2015). Les gènes modificateurs peuvent influencer la sévérité de la maladie de façon positive (gènes modificateurs protecteurs) ou négative (gènes modificateurs défavorables). La recherche de gènes modificateurs s'est principalement focalisée sur la modulation de la fonction pulmonaire, l'atteinte pulmonaire étant le principal facteur de sévérité de la mucoviscidose. Plusieurs gènes ont été identifiés : le *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1), la *mannose binding lectin 2* (MBL2) et l'haplotype ancestral 8.1AH (Corvol *et al.* 2015). Il a été montré par exemple qu'une augmentation de l'expression du TGF- β 1 était associée à une fonction respiratoire plus altérée. En 2015, une méta-analyse du génome entier de plus de 6 300 patients atteints de

mucoviscidose a permis de mettre en évidence cinq loci (*MUC4/MUC20*, *SLC9AA3*, *HLA-DRA*, *AGTR2/SLC6A14*, *EHF/APIP*) qui sont probablement associés avec la sévérité de l'atteinte pulmonaire (Corvol *et al.* 2015).

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

1.3. Manifestations cliniques extra-pulmonaires

La protéine CFTR est exprimée au pôle apical des cellules des épithélia sécréteurs. La mucoviscidose est donc une maladie qui touche différents organes. Malgré une atteinte pulmonaire prédominante, les manifestations secondaires sont variables d'un patient à l'autre.

1.3.1. Manifestations digestives

a) Manifestations gastro-intestinales

Certains enfants atteints de mucoviscidose sont diagnostiqués à la naissance suite à l'observation d'un iléus méconial présent chez 15 à 20 % des nourrissons (Ooi et Durie 2016). Il s'agit d'une absence d'émission du méconium (premières selles). Ce méconium peut complètement obstruer les intestins et provoquer de graves complications.

b) Manifestations pancréatiques

Une insuffisance pancréatique exocrine (IPE) est observée chez la majorité des patients atteints de mucoviscidose (Dodge et Turck 2006). Elle est la principale cause de pertes énergétiques au cours de la vie des patients CF. Le dysfonctionnement de CFTR va entraîner une hyperviscosité des sécrétions pancréatiques qui sont alors appauvries en eau et en bicarbonates et qui vont obstruer les canaux pancréatiques. Ceci engendre un défaut de production de lipase et de trypsine dans la lumière intestinale. La principale manifestation de l'IPE est une stéatorrhée (émission de selles anormalement grasses). L'IPE est également

responsable d'un syndrome de malabsorption des graisses et des protéines ce qui a un effet délétère sur l'état nutritionnel des patients CF avec un retard de croissance staturo-pondéral et des carences en vitamines liposolubles (A, D, E et K) ainsi qu'en acides gras essentiels.

c) Manifestations hépatobiliaires

L'atteinte hépatobiliaire est fréquente et elle est la deuxième cause de mortalité des patients atteints de mucoviscidose. L'absence partielle ou totale de CFTR fonctionnelle au niveau hépatique est responsable d'une augmentation de la viscosité de la bile et de la formation de bouchons muqueux obstruant les canaux biliaires vers la vésicule biliaire (O'Sullivan et Freedman 2009). Cette atteinte évolue rarement vers une cirrhose biliaire (10 à 15 % des cas). Afin de lutter contre la dénutrition et la malabsorption observée chez les patients CF, un enrichissement des apports nutritionnels est nécessaire (régime hyper énergétique) ainsi qu'une supplémentation en enzymes pancréatiques et vitamines.

1.3.2. Manifestations génitales

Les femmes atteintes de mucoviscidose sont, en général, fertiles bien que certaines présentent une hypofertilité due à une hyperviscosité de la glaire cervicale (Ahmad *et al.* 2013). Les grossesses chez les femmes atteintes de mucoviscidose ne sont plus rares.

Chez l'homme, il est retrouvé une stérilité par atrésie bilatérale congénitale des canaux déférents et une absence concomitante des vésicules séminales entraînant une azoospermie chez 98 % des hommes (Ahmad *et al.* 2013).

1.3.3. Manifestations osseuses

La protéine CFTR a été montrée comme exprimée dans les cellules osseuses humaines (ostéoblastes et ostéoclastes) mais de façon moindre par rapport aux cellules épithéliales (Jacquot *et al.* 2016). La prévalence de la maladie osseuse aussi appelée CFBD (*cystic fibrosis-related bone disease*) augmente avec l'âge des patients. Les mécanismes physiopathologiques de cette atteinte sont multiples et incomplètement élucidés. La malabsorption de la vitamine D en rapport avec l'IPE ou l'inflammation et l'infection

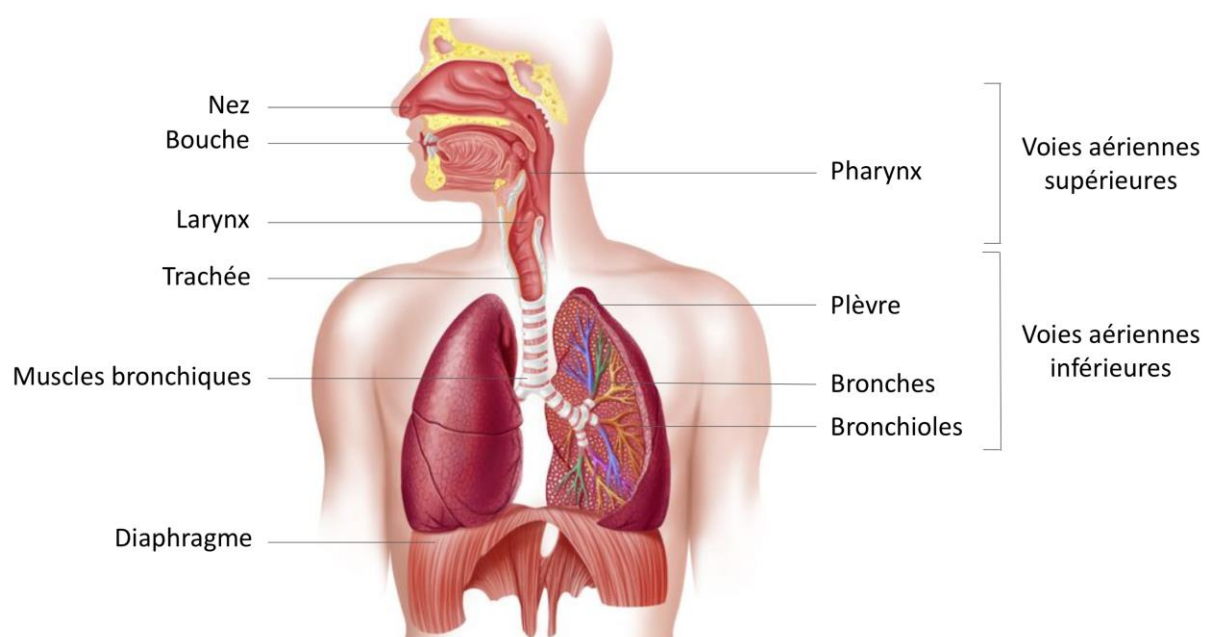
chroniques semblent jouer un rôle dans cette atteinte. Des travaux ont également montré l'implication du déficit de CFTR dans l'altération de l'activité ostéoblastique au cours de la mucoviscidose (Jacquot *et al.* 2016).

1.4. L'atteinte pulmonaire

1.4.1. Physiologie pulmonaire

a) Généralités

L'appareil respiratoire (Figure 7) est anatomiquement divisé en deux parties, les voies aériennes supérieures et inférieures.



**Figure 7 : Anatomie de l'appareil respiratoire.
Voies aériennes supérieures et inférieures.
(D'après <https://www.thoughtco.com/respiratory-system-4064891>).**

Les voies aériennes supérieures comprennent : la cavité nasale, la cavité buccale, le pharynx et le larynx. Les voies aériennes inférieures regroupent : la trachée, les bronches et les bronchioles. La principale fonction de l'appareil respiratoire est de permettre les échanges gazeux de dioxygène (O_2) et de dioxyde de carbone (CO_2) entre la circulation sanguine et l'air

atmosphérique. À chaque inspiration, l'air parcourt les voies aériennes jusqu'aux alvéoles qui offrent une surface d'échange importante permettant les échanges gazeux avec les capillaires sanguins. Les déchets gazeux sont ensuite expulsés au cours de l'expiration.

b) L'épithélium des voies aériennes

L'épithélium est un tissu composé d'une ou plusieurs couches de cellules étroitement juxtaposées et solidaires qui recouvrent la surface externe des organes ou les cavités internes de l'organisme. Les cellules épithéliales reposent toutes sur une lame basale qui les sépare du tissu conjonctif (Figure 8).

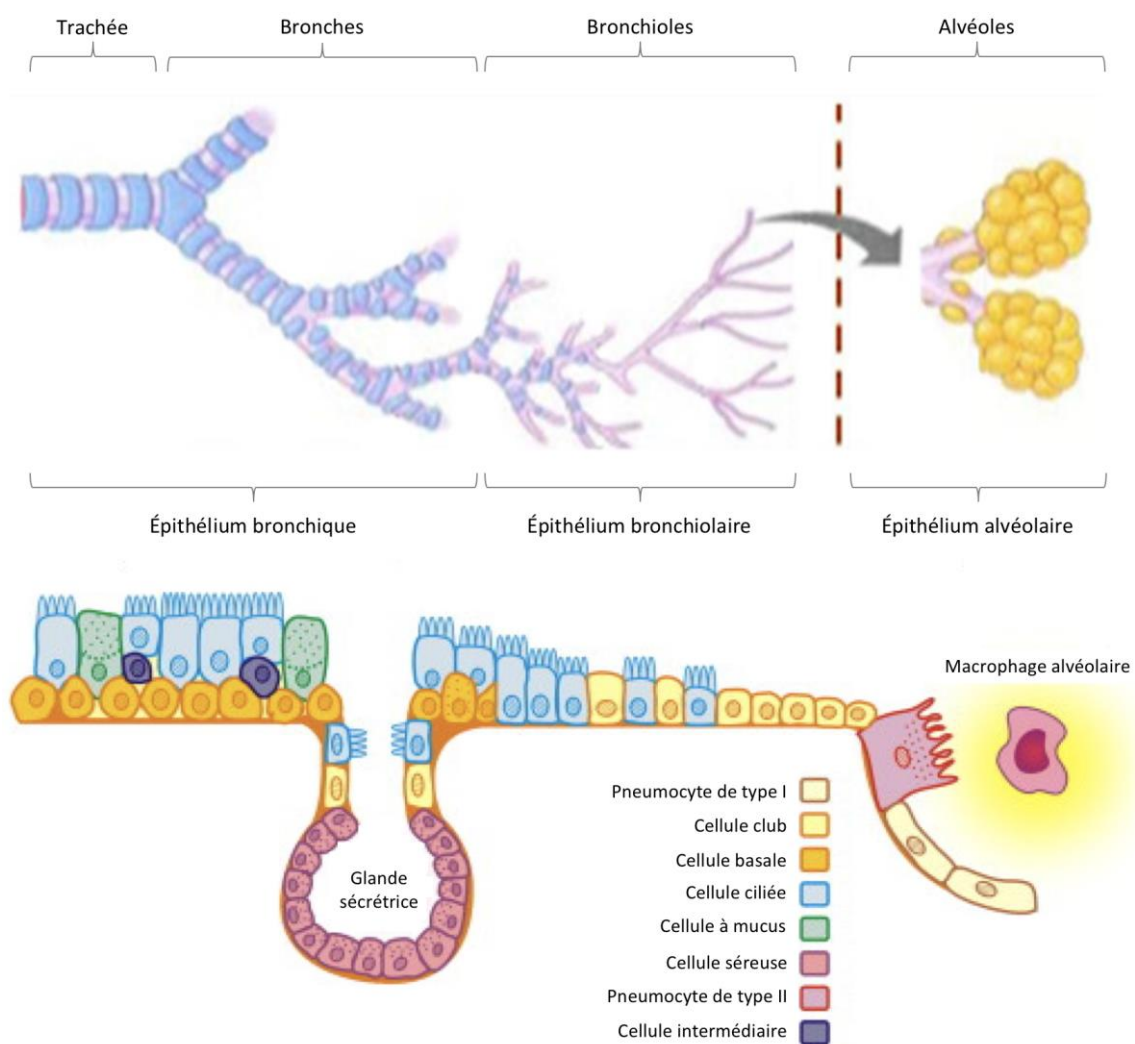


Figure 8 : Schéma représentant la répartition des différents types cellulaires le long de l'épithélium des voies aériennes.

L'épithélium des voies aériennes comprend trois segments : l'épithélium bronchique, l'épithélium bronchiolaire et l'épithélium alvéolaire ainsi que huit types cellulaires distincts.

(D'après Berube et al. 2010, Antunes et al. 2013).

L'épithélium des voies aériennes n'est pas le même selon son emplacement. L'arbre trachéo-bronchique est recouvert d'un épithélium pseudo-stratifié, les bronchioles terminales présentent un épithélium cuboïde simple et les alvéoles un épithélium simple.

Le rôle principal de l'épithélium des voies aériennes est la protection de la muqueuse respiratoire en regard des pathogènes inhalés. L'épithélium des voies aériennes présente une hétérogénéité des cellules qui le constituent (Figure 9), chacune des différentes populations assurant des fonctions différentes.

Les cellules ciliées

Les cellules ciliées représentent plus de 50 % des cellules épithéliales des voies aériennes (Spina 1998). La membrane apicale d'une cellule ciliée est bordée d'environ 300 cils. De nombreuses mitochondries sont retrouvées proche de la surface apicale des cellules ciliées, c'est une source d'énergie pour les cils qui vont battre de façon synchrone pour transporter le mucus des poumons vers les voies digestives, c'est ce que l'on appelle la clairance mucociliaire (Knight et Holgate 2003).

Les cellules à mucus

Les cellules à mucus ou cellules caliciformes sont des cellules qui vont sécréter des protéines appelées mucines stockées dans des granules au pôle apical des cellules ciliées. Les mucines secrétées sont hydratées pour former le mucus qui capte les particules étrangères et tout organisme potentiellement pathogène qui seront éliminés grâce à la clairance mucociliaire. La production d'une quantité correcte de mucus et sa viscoélasticité sont des paramètres importants pour une clairance mucociliaire efficace (Knight et Holgate 2003).

Les cellules séreuses

Les cellules séreuses sont présentes au sein des glandes sécrétrices. Elles ressemblent morphologiquement aux cellules à mucus. Elles sécrètent des protéines de défense telles que des anti-protéases.

Les cellules club

Les cellules club, anciennement cellules de Clara (Winkelmann et Noack 2010), sont principalement retrouvées au niveau de l'épithélium bronchiolaire. Elles possèdent des

granules de stockage de protéines. Elles vont notamment sécréter des protéines du surfactant alvéolaire et des protéines qui ont un rôle anti-inflammatoire (Singh et Katyal 1997).

Les cellules neuroendocrines

Les cellules neuroendocrines (ou cellules de Feyrter ou de Kultchinsky) sont présentes au niveau de la lame basale en très faible quantité. Elles possèdent le plus souvent une prolongation cytoplasmique étroite vers la lumière de l'épithélium des voies aériennes. Elles jouent un rôle dans le tonus des muscles lisses, l'activité ciliaire et la production de mucus.

Les cellules basales

Les cellules basales, présentes tout le long de l'épithélium pulmonaire (Evans et Plopper 1988), sont ancrées à la lame basale par des hémidesmosomes (Evans *et al.* 1990). En plus de leur rôle structural de barrière physique entre la lumière de l'épithélium pulmonaire et la membrane basale, elles sécrètent des médiateurs tels que des cytokines (Knight et Holgate 2003).

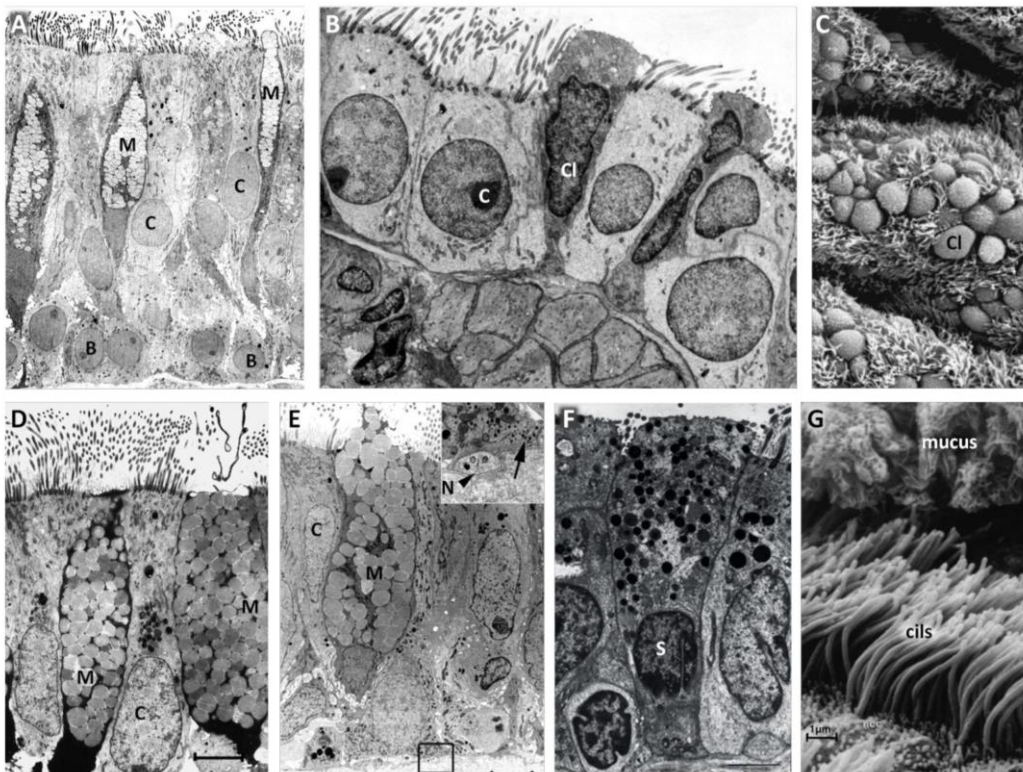


Figure 9 : Les différents types de cellules épithéliales des voies aériennes. Microscopie électronique à transmission montrant les cellules ciliées (C), basales (B), à mucus (M), séreuses (S), club (Cl) et neuroendocrines (N). (D'après Moran 1988, Jeffery et Li 1997, Gibson 2002, Ross 2006, Berube et al. 2010).

Les alvéoles, situées aux extrémités des bronchioles, sont le lieu des échanges gazeux entre l'air et la circulation sanguine *via* les capillaires sanguins. L'épithélium alvéolaire est donc différent de l'épithélium bronchique, il est composé de deux types cellulaires (Figure 10).

Les pneumocytes de type I

Les pneumocytes de type I sont de larges cellules aplaties. Ils représentent environ 95 % de la surface de l'épithélium alvéolaire, ce qui leur permet d'assurer leur fonction de recouvrement de l'alvéole pour des échanges gazeux optimisés.

Les pneumocytes de type II

Les pneumocytes de type II sont des cellules de forme cuboïde qui possèdent des microvillosités à leur pôle apical. Ils représentent 5 % de la surface de l'épithélium alvéolaire mais 60 % des cellules épithéliales alvéolaires (Castranova *et al.* 1988). Les pneumocytes de type II contiennent des corps lamellaires et des granules contenant le surfactant pulmonaire.

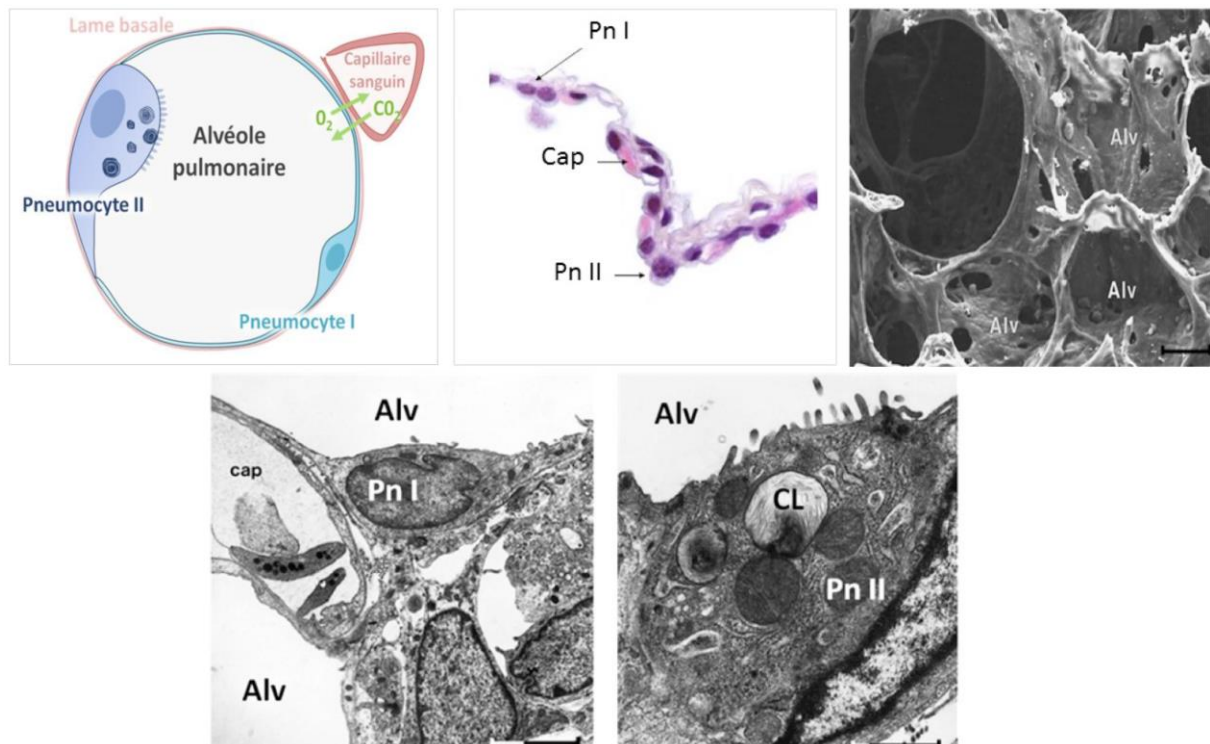


Figure 10 : L'épithélium alvéolaire.
Représentation schématique de l'épithélium alvéolaire et images de microscopie optique (Alv : alvéoles, Cap : capillaires, Pn I : pneumocytes de type I, Pn II : pneumocytes de type II).
(D'après Gibson 2002, Glowacka *et al.* 2011).

c) Le liquide de surface des voies aériennes

Le liquide de surface des voies aériennes recouvre l'épithélium des voies aériennes. Il a pour rôle d'éviter la déshydratation du tissu pulmonaire et de piéger les particules et pathogènes inhalés pour les évacuer vers l'appareil digestif grâce à la clairance mucociliaire.

Le liquide de surface recouvrant l'épithélium bronchique et bronchiolaire est composé de deux couches : le liquide périciliaire et le mucus (

Figure 11).

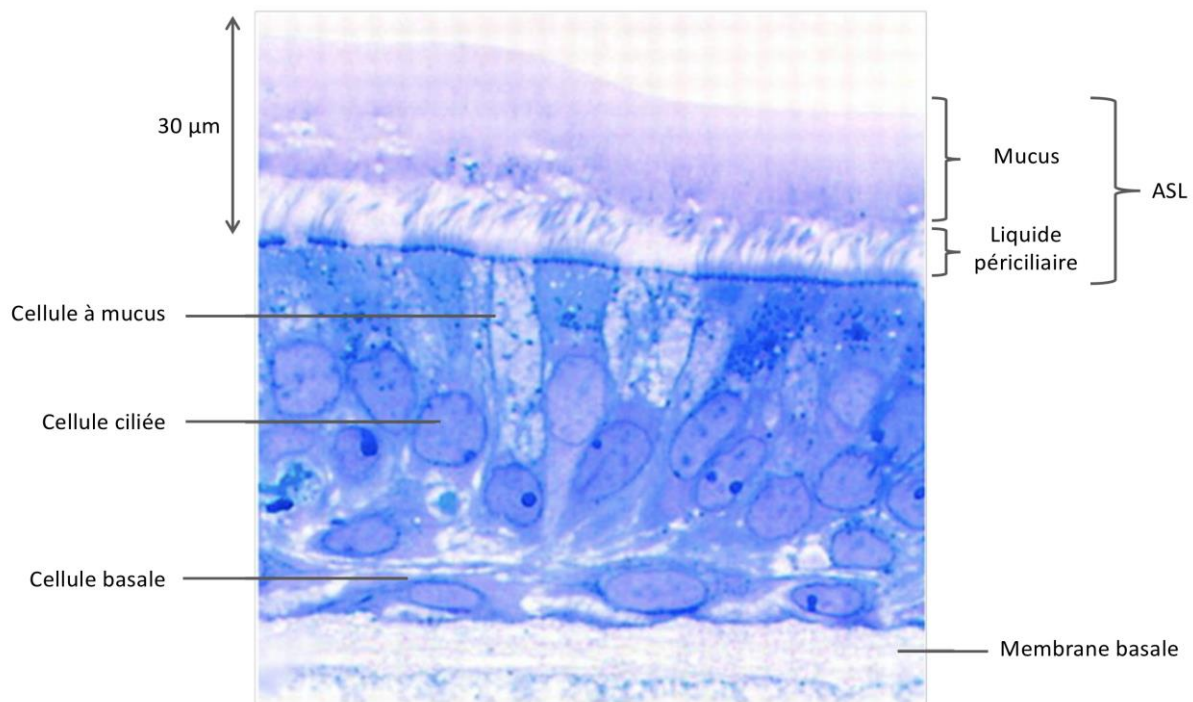


Figure 11 : Liquide de surface des voies aériennes.
Image de microscopie optique d'une culture de cellules épithéliales bronchiques humaines cultivées en interface air-liquide (ASL : liquide de surface des voies aériennes).
(D'après Matsui et al. 1998).

Le liquide périciliaire est une couche aqueuse d'environ 7 µm de hauteur dans laquelle battent les cils. Ce liquide est généré par les mouvements ioniques transépithéliaux (Sleigh *et al.* 1988). Le mucus recouvre le liquide périciliaire. Il est constitué à 95 % d'eau mais contient également des ions, des glycoprotéines et des lipides. Il contient également des anti-protéases, des antioxydants et des peptides antimicrobiens qui participent à la défense de l'épithélium des voies aériennes.

L'épithélium alvéolaire est lui recouvert de surfactant produit par les pneumocytes de type II. Il a pour rôle d'empêcher le collapsus pulmonaire au cours de l'expiration mais il joue également un rôle dans la défense immunitaire en stimulant notamment les macrophages alvéolaires.

1.4.2. Physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose

L'évolution de l'atteinte pulmonaire est un facteur important de survie des patients atteints de mucoviscidose. Au niveau de l'épithélium bronchique des patients CF, les mutations de *CFTR* vont entraîner l'absence ou la dysfonction de la protéine CFTR. Ceci va entraîner des changements dans la composition du liquide de surface des voies aériennes avec une hyperabsorption d'eau et de Na⁺ et une hyposécrétion de Cl⁻ ce qui va entraîner une déshydratation du mucus qui devient visqueux et en conséquence une diminution de la clairance mucociliaire (Boucher 2002). L'altération du système de défense des voies aériennes constitué par la clairance mucociliaire favorise la mise en place de cycles d'infection et d'inflammation chronique chez les patients. Les voies aériennes des patients CF sont colonisées par divers organismes pathogènes. Les jeunes patients CF sont généralement infectés par *Haemophilus influenzae*, puis *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) et enfin par *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), bactérie qui colonise de façon chronique les patients CF y compris à l'âge adulte (Figure 12, registre français de la mucoviscidose de 2016).

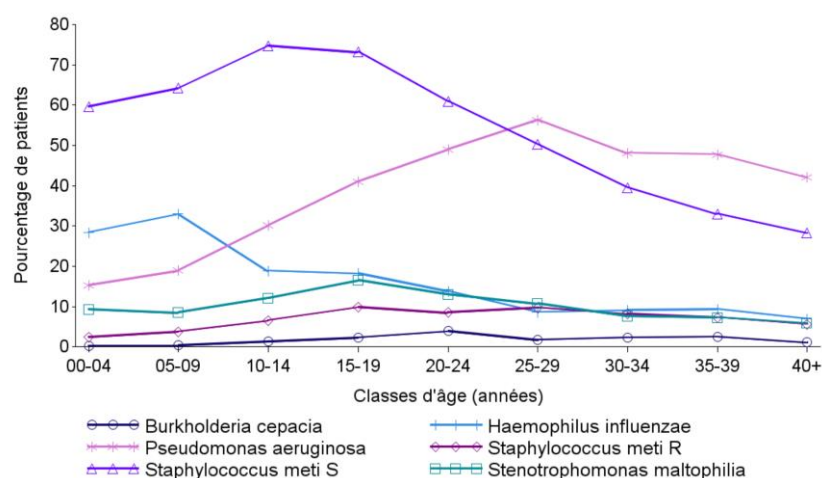


Figure 12 : Représentation des bactéries cliniquement importantes dans la mucoviscidose par classes d'âges en France.

(D'après le registre français de la mucoviscidose de 2016).

Au cours de leurs vies, les patients CF peuvent être colonisés par d'autres pathogènes moins fréquents que *P. aeruginosa* tel que *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*).

Les voies aériennes sont également le siège d'une inflammation sévère et précoce qui devient rapidement chronique. Les cycles d'infection et d'inflammation chroniques aboutissent à long terme à la dégradation de l'épithélium pulmonaire entraînant progressivement l'insuffisance respiratoire terminale des patients (Figure 13).

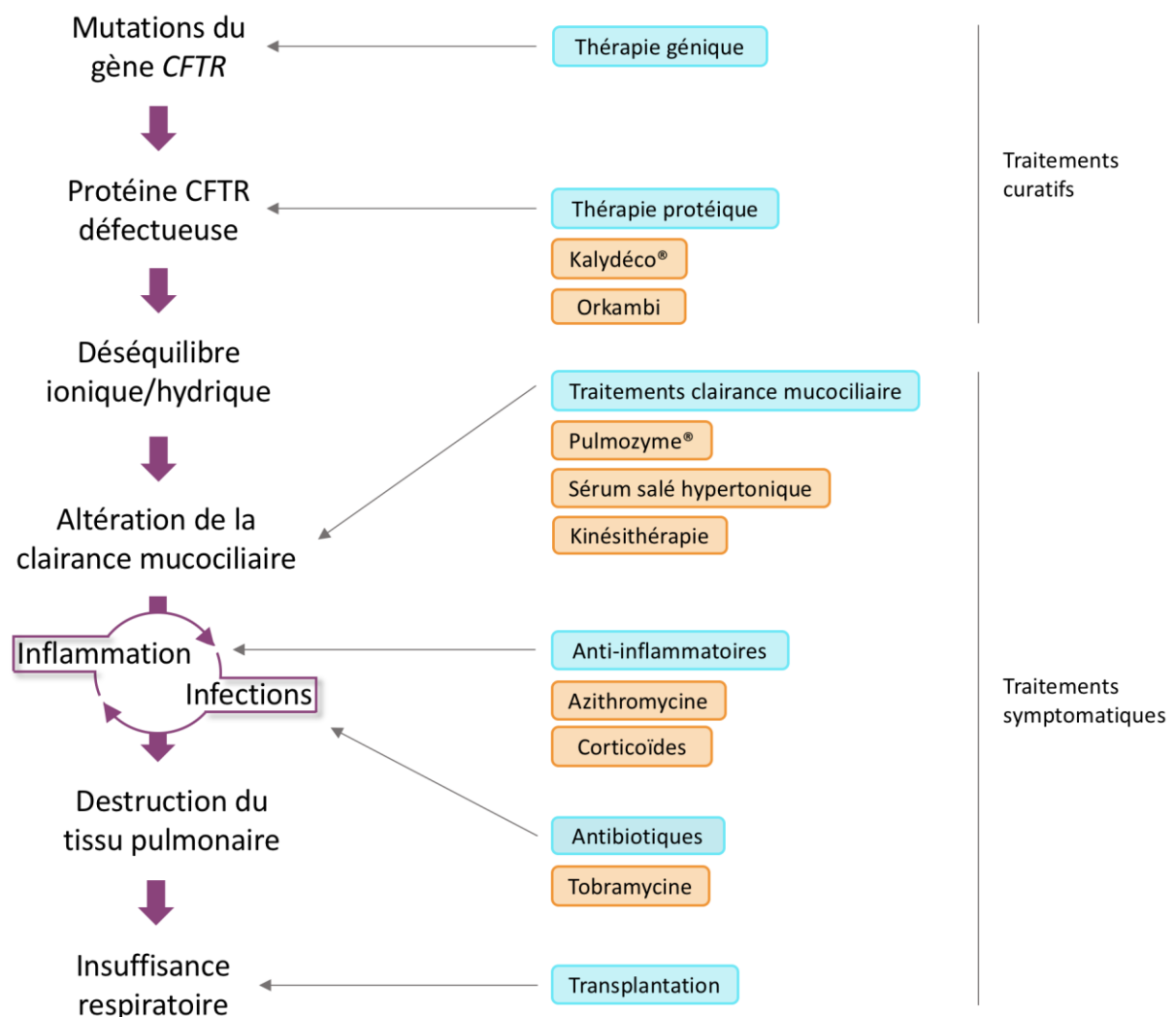


Figure 13 : Schéma récapitulatif des conséquences des mutations du gène *CFTR* au niveau des voies aériennes et stratégies thérapeutiques pour la prise en charge de l'atteinte respiratoire. Les mutations du gène *CFTR* vont entraîner la production d'une protéine CFTR défectueuse et un déséquilibre ionique et hydrique à l'origine d'une altération de la clairance mucociliaire. Ceci va favoriser la mise en place de cycles d'infections et d'inflammation qui à terme vont détruire le tissu pulmonaire aboutissant à une insuffisance respiratoire. Il existe des traitements à visée curative et des traitements symptomatiques de la mucoviscidose.

Afin de prendre en charge l'atteinte pulmonaire des patients CF, il existe des traitements symptomatiques, notamment :

- des traitements de la clairance mucociliaire : la DNase recombinante humaine (Pulmozyme® ou rhDNase, mucolytique utilisé par nébulisation), le sérum salé hypertonique mais également la kinésithérapie respiratoire,
- des traitements anti-infectieux : les antibiotiques (tobramycine inhalée par exemple),
- des traitements anti-inflammatoires : l'azithromycine ou les corticoïdes inhalés.

Il existe également des nouvelles stratégies thérapeutiques à visée curative. Il s'agit de thérapies visant à corriger CFTR à travers la thérapie génique ou protéique. La thérapie génique repose sur la stratégie de remplacement du gène *CFTR* défectueux par un gène sain. La thérapie protéique est une approche pharmacologique faisant intervenir des correcteurs ou des potentiateurs de CFTR en fonction du type de mutation de *CFTR*. La société Vertex Pharmaceuticals est leader sur le marché. Dans un premier temps, ils ont commercialisé le Kalydéco® (ou Ivacaftor ou VX-770), potentiateur de la conductance Cl⁻ de CFTR ciblant les mutations de classe III, puis l'Orkambi, association du VX-770 à un correcteur le VX-809 (ou Lumacaftor) permettant de réexprimer la protéine CFTR à la membrane et de stimuler son activité chez les patients de plus de 12 ans homozygotes pour la mutation F508del (Wainwright *et al.* 2015).

La transplantation reste le dernier recours pour les patients présentant une insuffisance respiratoire sévère engageant le pronostic vital (Figure 13).

1.4.3. Les cycles d'infection-inflammation

L'atteinte pulmonaire, caractérisée par des cycles d'infection et d'inflammation chroniques, est responsable de la mortalité et de la morbidité des patients atteints de mucoviscidose. Les altérations respiratoires s'installent dès les premiers mois de vie et vont s'amplifier jusqu'au décès du patient. De nombreux travaux ont montré que chez de très jeunes patients il semblait y avoir une augmentation des paramètres inflammatoires, même en l'absence d'infection (Muhlebach *et al.* 1999). Mais ceci reste controversé (Bragonzi *et al.* 2018). Dès 1994, Konstan rapporte l'augmentation de marqueurs inflammatoires dans les produits de

lavages bronchoalvéolaires de patients atteints de mucoviscidose ayant une atteinte modérée et stable (Konstan *et al.* 1994). La question est alors de savoir si cette inflammation est endogène ou provoquée par des phénomènes exogènes comme l'infection.

L'infection bactérienne dominée par *P. aeruginosa* est un facteur indéniable d'entretien de l'inflammation (Pier 2000). Elle entraîne une augmentation de la sécrétion d'interleukine 8 (IL-8), cytokine pro-inflammatoire reconnue comme le marqueur de l'inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose. L'hypersécrétion d'IL-8 va induire un recrutement massif de neutrophiles au niveau des voies aériennes. Les neutrophiles vont entraîner la libération d'ADN responsable d'une exacerbation des phénomènes sécrétoires augmentant encore l'hyperviscosité du mucus (Figure 14). L'accumulation des neutrophiles va également provoquer une augmentation de la production de ROS. Il est également retrouvé dans les voies aériennes de patients CF, un déséquilibre protéases-antiprotéases en faveur d'une augmentation des protéases produites par les neutrophiles (Birrer 1995) ainsi que celles libérées par *P. aeruginosa* (élastase).

Les travaux de Khan ont été les premiers à émettre l'hypothèse que l'infection pourrait succéder à l'inflammation (Khan *et al.* 1995). Il a été montré une augmentation du nombre de neutrophiles, des taux d'IL-8 et une activité élastase plus importante dans les produits de lavages bronchoalvéolaires de 16 nourrissons CF (âge moyen de 6 mois) par rapport à 11 témoins, en l'absence d'infection établie. Les travaux de Balough la même année confirment ces résultats en montrant une augmentation des taux d'IL-1 β et de TNF- α (*tumor necrosis factor α*) (Balough *et al.* 1995). De nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont augmentées dans la mucoviscidose de façon précoce et persistante. En effet, il a été montré que les lavages bronchoalvéolaires de patients CF présentaient des concentrations élevées en IL-8, IL-6, IL-1 β et TNF- α (Sagel *et al.* 2007). Ces cytokines secrétées par les cellules épithéliales sont augmentées par l'activation du facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) (Tirouvanziam *et al.* 2000, Eidelman *et al.* 2001) qui est activé par une interaction cellule-bactérie, des produits bactériens ou des cytokines pro-inflammatoires. D'autres voies de signalisation pourraient être impliquées dans la promotion de la réponse inflammatoire notamment les voies MAPK/ERK (*mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*) et AP-1 (*activated protein 1*). Au contraire, d'autres cytokines dites anti-inflammatoires telles que l'IL-10 sont diminuées dans les lavages bronchoalvéolaires de

patients CF. En plus des cellules épithéliales, d'autres cellules inflammatoires, telles que les macrophages ou les lymphocytes T et B sont présentes dans les voies aériennes des patients CF et jouent également un rôle dans la réponse inflammatoire (Sagel *et al.* 2007).

L'analyse de sputums de patients CF a permis de mettre en évidence des marqueurs de l'inflammation pulmonaire chez ces patients, notamment des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8 par exemple) mais aussi de nombreuses autres molécules telles que des éicosanoïdes (prostaglandine E2, PGE2, par exemple) (Sagel *et al.* 2007).

La mise en place d'une inflammation chronique est générée par l'échec de la clairance microbienne et la création d'un microenvironnement local toxique pro-inflammatoire. En effet, il a été montré que la présence de mucus épais limitait la sécrétion par les glandes sous muqueuses de peptides antimicrobiens ce qui favorisait la persistance des bactéries dans les voies aériennes des patients CF (Doring et Gulbins 2009) (Figure 14). De plus, l'acidification des voies aériennes par le CFTR anormal est un facteur majeur qui initie les anomalies de défense contre les pathogènes et la colonisation bactérienne (Bhagirath *et al.* 2016).

Les cycles d'infection et d'inflammation deviennent rapidement chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose entraînant à terme des lésions de l'épithélium bronchique jusqu'à sa destruction.

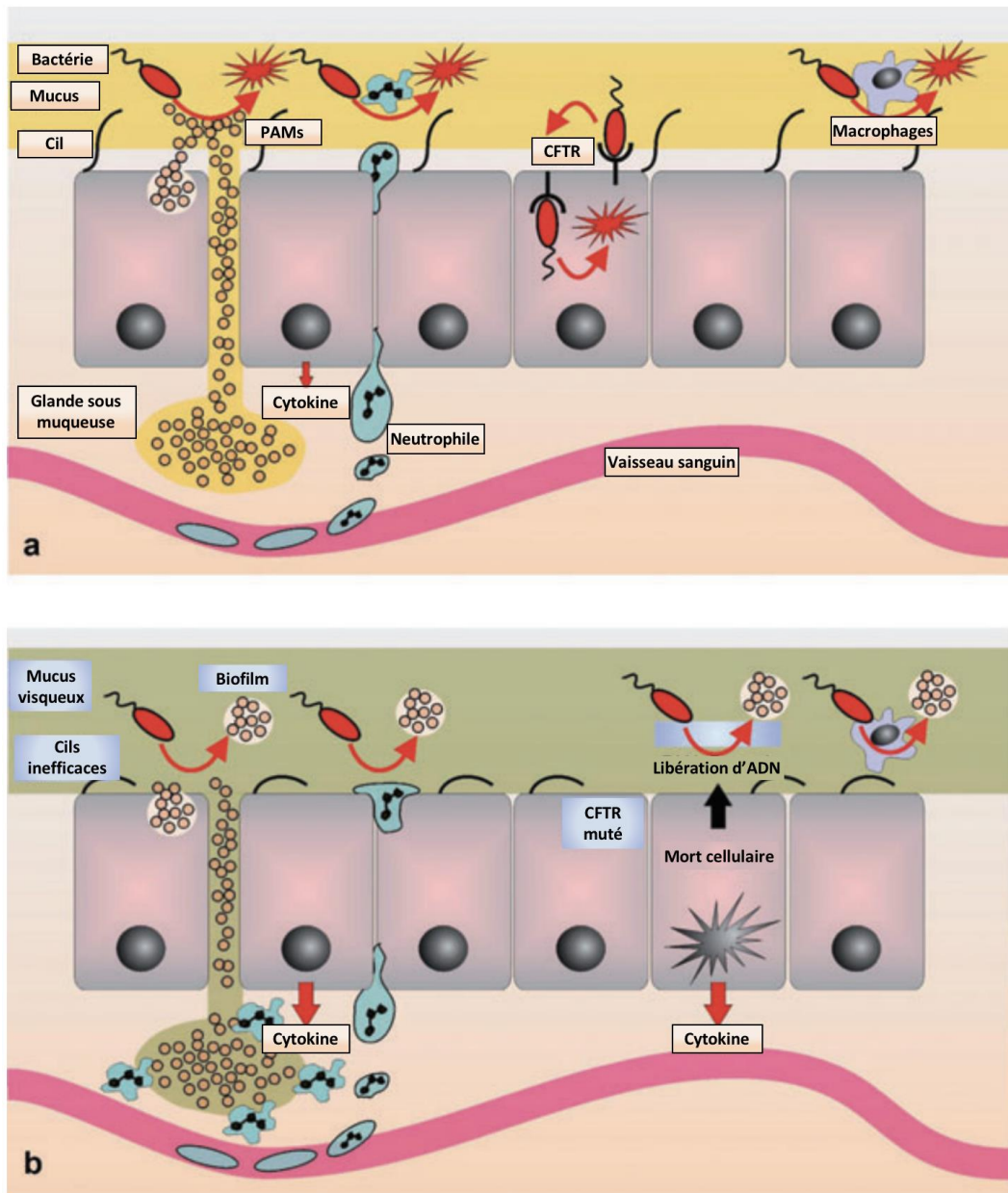


Figure 14 : Mécanismes de destruction bactérienne de l'immunité innée dans les voies aériennes d'individus sains et de patients CF.

(a) Individus sains : les pathogènes présents dans le liquide de surface des voies aériennes sont éliminés par l'action de PAMs (peptides antimicrobiens) et par l'action des neutrophiles et des macrophages recrutés. (b)

Patients CF : la viscosité du mucus et l'inefficacité des cils ne permet pas la clairance mucociliaire des pathogènes en limitant notamment la production de PAMs. De plus l'hypersécrétion de cytokines telles que l'IL-8 va induire une accumulation de neutrophiles. Les neutrophiles vont entraîner la libération d'ADN augmentant l'hyper viscosité du mucus.

(D'après Doring et Gulbins 2009).

1.4.4. *Pseudomonas aeruginosa*

a) Généralités

P. aeruginosa est une bactérie ubiquitaire Gram négatif, saprophyte retrouvée dans l'eau, les sols humides ou à la surface des végétaux. C'est une bactérie motile grâce à son flagelle monotriche, capable de former un biofilm (Figure 15). *P. aeruginosa* est une bactérie opportuniste pour l'homme, elle peut coloniser un individu et devenir pathogène lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies. *P. aeruginosa* est responsable d'infections nosocomiales ou communautaires.

Il existe une très grande variabilité génétique de *P. aeruginosa* (au moins 10 % du génome) qui a été démontrée chez la souche de référence PAO1 par rapport à différentes souches environnementales ou de laboratoire (Stover *et al.* 2000). De cette façon, le génome de *P. aeruginosa* est en constante évolution, lui permettant de s'adapter à chaque environnement, notamment en présence de l'hôte ou d'agents antimicrobiens.

P. aeruginosa est responsable d'infections respiratoires chroniques chez les patients immunodéprimés (VIH, chimiothérapie) et représente la première cause de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose.

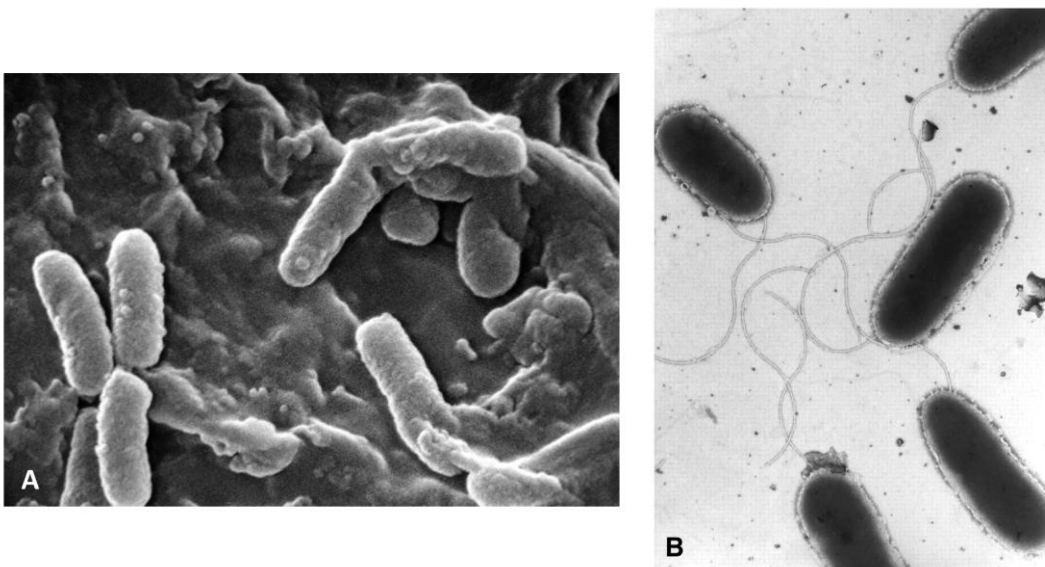


Figure 15 : *Pseudomonas aeruginosa*.
(A) Observation au microscope électronique à balayage (d'après https://fr.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa). **(B) Observation par microscopie électronique en transmission.**
(D'après Garrett et al. 1999).

b) Facteurs de virulence

P. aeruginosa possède un grand nombre de facteurs de virulence impliqués dans sa pathogénicité. Les facteurs de virulence regroupent aussi bien des toxines qui ont pour rôle d'endommager l'hôte, que des molécules reconnues par le système immunitaire appelées PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*). Il existe des facteurs de virulence sécrétés et membranaires (Figure 16). Parmi les facteurs de virulence membranaires, les principaux sont le LPS (lipopolysaccharide) et la flagelline de *P. aeruginosa*.

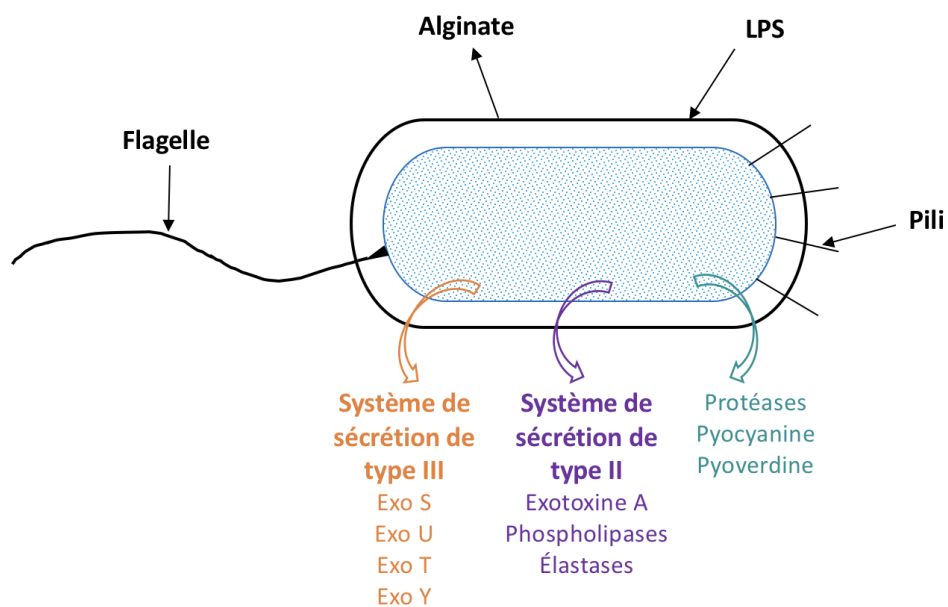


Figure 16 : Facteurs de virulence de *P. aeruginosa*.
P. aeruginosa possède des facteurs de virulence sécrétés (couleur) et membranaires (noir).
(D'après Sadikot et al. 2005).

Le LPS

Le LPS est un composant de la membrane externe des bactéries Gram négatif. Il est composé de 3 domaines :

- le lipide A : région hydrophobe qui permet l'ancrage à la membrane externe. Cette partie ne peut pas être déléetée. C'est le lipide A qui est reconnu par l'hôte *via* sa liaison avec TLR4 (*toll-like receptor 4*), un récepteur membranaire de l'hôte impliqué dans l'immunité innée et la reconnaissance des pathogènes.

- le noyau (ou *core*) : partie oligosaccharidique dont la composition varie d'une bactérie à l'autre.
- l'antigène O : partie polysaccharidique qui dépasse de la membrane externe. Cette partie est spécifique d'une espèce. Ce domaine peut être absent, on parle alors de phénotype rugueux ; au contraire lorsqu'il est présent, on parle de phénotype lisse. Les isolats cliniques de patients chroniquement infectés par *P. aeruginosa* présentent généralement un phénotype rugueux (Ernst *et al.* 1999).

P. aeruginosa est capable de modifier suffisamment la structure du lipide A pour masquer sa présence vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte. Il a par exemple été retrouvé dans des isolats cliniques de patients atteints de mucoviscidose, des souches de *P. aeruginosa* présentant une palmitoylation du lipide A (Ernst *et al.* 2007). Néanmoins, en l'absence de toute modification, le LPS seul est capable d'activer les cellules épithéliales pulmonaires et les macrophages alvéolaires (Raoust *et al.* 2009).

La flagelline

La flagelline est le composant du flagelle permettant la chimiotaxie et la mobilité de la bactérie et donc responsable de sa virulence. Le flagelle de *P. aeruginosa* est composé de trois parties : le corps basal qui sert de moteur en fournissant de l'énergie afin de mouvoir le flagelle, le crochet de torsion qui est l'élément connecteur entre le corps basal et le filament qui représente le flagelle à proprement parler. Le filament flagellaire est composé d'environ 20 000 sous-unités de flagelline appelée FliC. C'est uniquement le filament du flagelle qui est capable d'induire une réponse immunitaire *via* la flagelline reconnue par le TLR5 de l'hôte (Descamps *et al.* 2012). Le flagelle est également indispensable pour la formation d'un biofilm (O'Toole et Kolter 1998). L'expression du flagelle de *P. aeruginosa* est perdue lors du passage du mode de vie planctonique au mode de vie biofilm qui est le mode de vie adopté par les souches chroniques dans la mucoviscidose.

Autres facteurs de virulence

P. aeruginosa possède un autre facteur de virulence membranaire que sont les pili. Ce sont de petites structures polaires qui sont impliquées dans l'attachement aux surfaces et qui permettent également à la bactérie de se mouvoir sur une surface par un mécanisme appelé

twitching, en se rétractant et s'étirant. Ils permettent à la bactérie d'envahir les surfaces hydratées et de coloniser rapidement les voies respiratoires.

P. aeruginosa produit également de l'alginate, exopolysaccharide qui rend l'éradication de la bactérie très difficile dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose, à cause de sa capacité à jouer un rôle de bouclier contre les antibiotiques et les défenses de l'hôte (Bayer *et al.* 1991). La production d'alginate est également associée à la transformation de la bactérie de sa forme classique non mucoïde vers une forme mucoïde, qui est associée à un déclin de la fonction respiratoire et du taux de survie (Pedersen *et al.* 1992).

P. aeruginosa possède également des facteurs de virulence sécrétés qui vont interférer avec la réponse immunitaire de l'hôte mais également entraîner la mort cellulaire. Ces facteurs sont donc qualifiés de toxines. Les moyens de sécrétion de ces toxines se font grâce à six systèmes de sécrétion de *P. aeruginosa*. Parmi ceux-là, deux sont particulièrement impliqués dans la pathogénicité de la bactérie : les systèmes de sécrétion de type II (SST2, codé par le gène *xcp*) et de type III (SST3, codé par le gène *psc*). Le SST2 va permettre la sécrétion de toxines dans le milieu extracellulaire (exotoxine A, élastases, phospholipases, etc.). Le SST3 va quant à lui injecter les toxines directement dans les cellules de l'hôte notamment des exoenzymes (Exo U, Exo S, Exo T, Exo Y). Ces toxines ont pour effet la mort cellulaire ou le dysfonctionnement de la cellule en détruisant la membrane, en perturbant les cascades de transduction des signaux ou en désorganisant le cytosquelette (Hueck 1998). Le SST6 a récemment été étudié et proposé comme participant à la pathogénicité de *P. aeruginosa* par la translocation d'effecteurs dans les cellules de l'hôte (Jiang *et al.* 2016). Il existe d'autres facteurs de virulence sécrétés, tels que des pigments (pyocyanine et pyoverdine ou fluorescéine) qui sont utiles à la survie des bactéries.

c) Infection à *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose

P. aeruginosa colonise les patients atteints de mucoviscidose dès le plus jeune âge par une souche environnementale qui va s'adapter à l'environnement pulmonaire de l'hôte afin de persister (Folkesson *et al.* 2012). Il y a trois stades dans la colonisation à *P. aeruginosa* :

- un stade intermittent pendant lequel les voies aériennes sont colonisées par différentes souches de *P. aeruginosa* de façon récurrente.

- un stade de transition où *P. aeruginosa* persiste dans les voies aériennes mais présente encore un phénotype environnemental.
- un stade chronique qui se traduit par une augmentation croissante de bactéries retrouvées dans les expectorations et corrélée à un niveau d'inflammation plus élevé.

Il peut exister des variants génotypiques et phénotypiques de *P. aeruginosa* dans les poumons de patients CF qui contribuent aux différents aspects de la progression de la maladie et des exacerbations pulmonaires (Bhagirath *et al.* 2016).

L'infection chronique à *P. aeruginosa* est un facteur d'augmentation des dommages du tissu pulmonaire et est associée à une diminution de la fonction respiratoire (Wagner et Iglewski 2008).

Il existe différents facteurs de risque liés à l'infection à *P. aeruginosa*. Les femmes ont plus de risques d'être colonisées par *P. aeruginosa* que les hommes. De plus, les patients homozygotes pour la mutation F508del ou co-infectés avec d'autres pathogènes comme *S. aureus* ont également plus de risques d'être colonisés par *P. aeruginosa* (Maselli *et al.* 2003).

L'infection chronique à *P. aeruginosa* est associée à des changements génotypiques et phénotypiques de la bactérie notamment une augmentation de la résistance aux antibiotiques, une diminution du métabolisme, un taux de croissance plus lent ou un manque de mobilité (Bhagirath *et al.* 2016). Une fois établie, l'infection chronique est quasiment impossible à éradiquer bien qu'il puisse y avoir une présence saisonnière de la bactérie avec des périodes de réinfection et de colonisation.

1.4.5. Analyse transcriptomique

L'épithélium joue un rôle essentiel dans la lutte contre les infections. Dans la mucoviscidose, l'installation d'une infection chronique à *P. aeruginosa* et d'une réponse inflammatoire exacerbée pourrait être liée à une altération de la réponse des cellules épithéliales ne permettant pas la mise en place d'une défense adéquate.

Une étude de notre équipe publiée en 2015 (Balloy *et al.* 2015) a émis l'hypothèse que l'infection à *P. aeruginosa* entraînerait une réponse inadaptée des cellules épithéliales CF par

rapport à des cellules normales. Ils ont pu montrer que cette réponse était effectivement différente par une analyse comparative des transcriptomes de cellules épithéliales bronchiques primaires de donneurs sains non-CF et de patients CF infectées par *P. aeruginosa* (souche de laboratoire PAK). Cette étude avait pour but de déterminer, en dehors des molécules classiquement associées à l'infection par *P. aeruginosa* (comme l'IL-8), les gènes surexprimés et ceux sous-exprimés en réponse à l'infection à *P. aeruginosa* dans les cellules primaires CF par rapport aux cellules non-CF ce qui pourrait expliquer la forte réponse inflammatoire et l'infection chronique à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose.

De nombreux gènes ont été identifiés comme sous-exprimés ou surexprimés dans les cellules CF avant et après l'infection à *P. aeruginosa* (Figure 17).

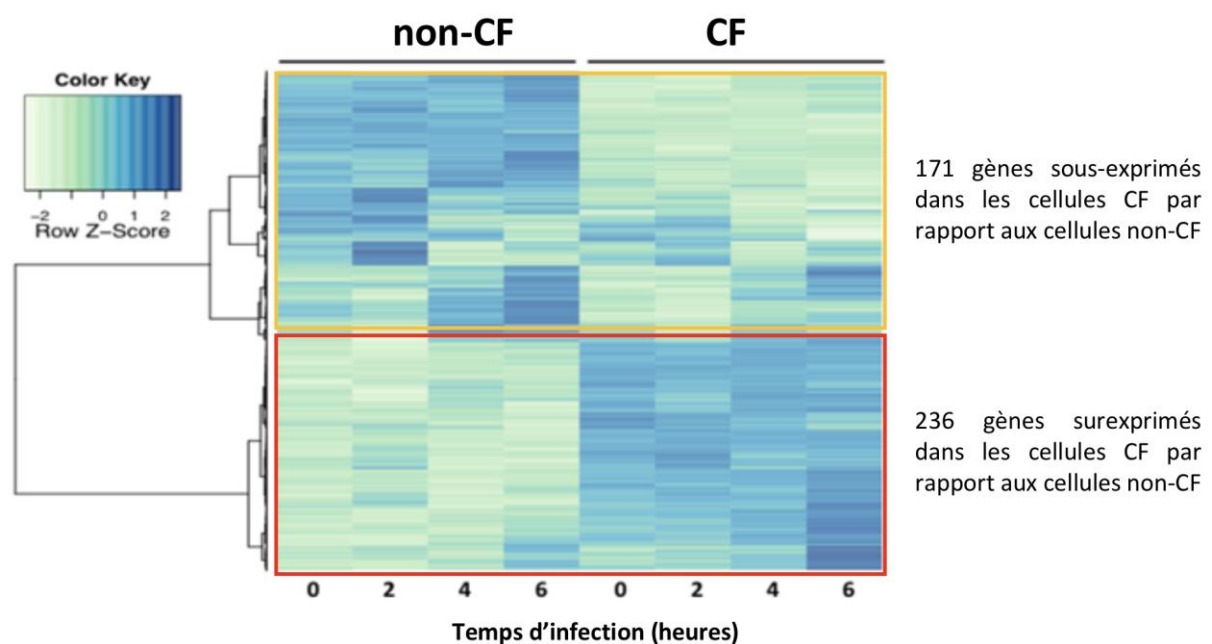


Figure 17 : Profils d'expression des transcriptomes des cellules non-CF et CF au cours de l'infection à *P. aeruginosa*.

Le Row Z-Score est représentatif de l'expression des gènes, plus il est élevé plus le gène est exprimé. 171 gènes sont significativement moins exprimés dans les cellules CF par rapports aux cellules non-CF. 236 gènes sont significativement plus exprimés dans les cellules CF par rapport aux cellules non-CF.

(D'après Balloy et al. 2015).

Dans les cellules non-CF, il a été montré une surexpression de gènes qui codent pour des effecteurs de l'immunité innée reflétant un combat contre l'infection bactérienne. Il a été

observé une augmentation des paramètres inflammatoires tels que l'IL-8, l'IL-6, CCL2 (*chemokine ligand 2*) ou le TNF- α dans les cellules non-CF et CF en réponse à l'infection à *P. aeruginosa* et ces paramètres étaient surexprimés dans les cellules CF par rapport aux cellules non-CF. Enfin, la plupart des gènes surexprimés dans les cellules non-CF en réponse à l'infection par *P. aeruginosa* et qui étaient absents dans les cellules CF sont des gènes qui jouent un rôle dans l'intégrité tissulaire.

Cette étude a permis d'identifier un gène parmi les plus différenciellement exprimés entre les cellules non-CF et CF à l'état basal et au cours de l'infection par *P. aeruginosa*, il s'agit de *CHAC1*.

2. CHAC1

CHAC1 ou *MGC4504* pour *cation transport regulator-like protein 1* ou *ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1*, est un gène récemment identifié chez les mammifères. Il code pour une protéine du même nom. Ses homologues chez la bactérie *chaC*, chez la levure YER163C et chez la souris *ChaC* ou *Botch* ont également été identifiés.

2.1. Gène et protéine CHAC1

2.1.1. Gène CHAC1

Le gène *CHAC1* (Figure 18), est retrouvé sur le bras long du chromosome 15 en position 15q15.1. Il est composé de 4 exons et d'environ 14,3 kb. Ce gène est à l'origine de la synthèse d'un ARNm de 6 kb qui va ensuite être traduit en protéine CHAC1.

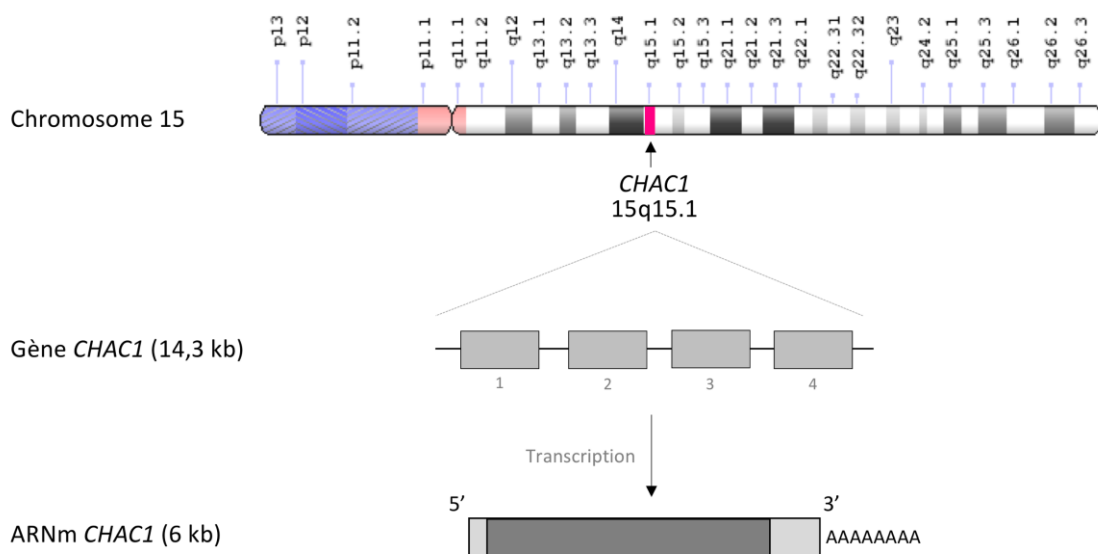


Figure 18 : Du gène à l'ARNm *CHAC1*.

De haut en bas : Localisation du gène *CHAC1* dans la région q15.1 du chromosome 15 humain, représentation du gène *CHAC1* faisant apparaître les exons (rectangles gris), ARNm *CHAC1*.

Le gène *CHAC1* est très conservé entre les espèces. Il y a environ 30 % d'homologie entre le gène *CHAC1* des mammifères et celui des bactéries ce qui suggère un rôle fondamental de *CHAC1* pour la survie (Mungrue *et al.* 2009).

2.1.2. Protéine CHAC1

Il existe 5 isoformes de la protéine CHAC1 codées par cinq variants de l'ARNm de *CHAC1* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?LinkName=gene_nucore_refseqrna&from_uid=79094) (Tableau 1). La première isoforme décrite est l'isoforme 1.

| Nom | Identifiant du transcrit | Paires de bases | Protéine (acides aminés) | Identifiant protéine (UniProt) |
|-----------|--------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------------|
| CHAC1-001 | ENST00000446533.7 | 1849 | 264 | Q9BUX1 |
| CHAC1-002 | ENST00000487220.1 | 853 | 37 | H0YK90 |
| CHAC1-003 | ENST00000444189.6 | 1204 | 219 | Q9BUX1 |
| CHAC1-004 | ENST00000617961.1 | 1498 | 222 | A0A0C4DGX1 |
| CHAC1-201 | ENST000006617768.4 | 1560 | 264 | Q9BUX1 |

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des 5 variants de l'ARNm de *CHAC1* et des 5 isoformes protéiques correspondantes.
(D'après la base de données Ensembl ENSG00000128965).

La protéine CHAC1 est localisée principalement dans le cytosol des cellules (Figure 19) (Mungrue *et al.* 2009).

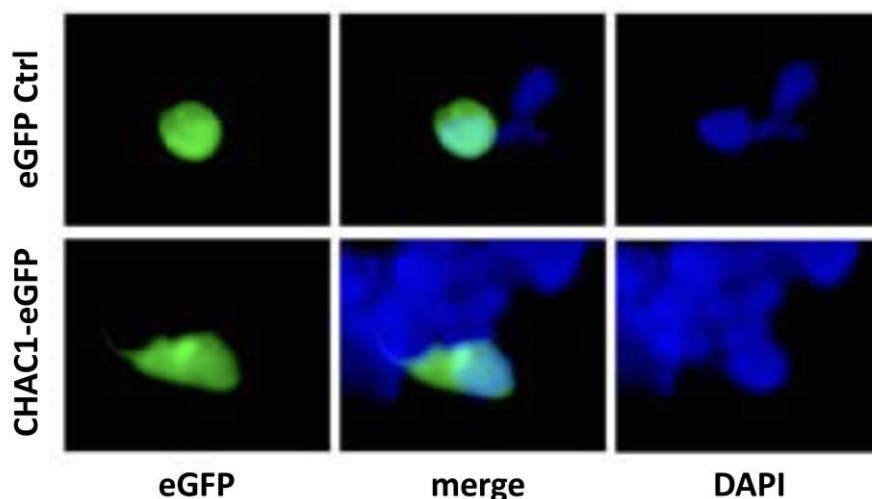


Figure 19 : Immunofluorescence de la protéine CHAC1.
Images de fluorescence de la eGFP (vert) et des noyaux (DAPI, bleu) dans des cellules HEK 293 (*human embryonic kidney cells 293*) transfectées avec un plasmide CHAC1-eGFP ou eGFP contrôle (eGFP Ctrl).
(D'après Mungrue *et al.* 2009).

D'après différentes bases de données, CHAC1 est retrouvé dans de nombreux tissus variés, mais l'expression tissulaire de CHAC1 est plus importante dans le tractus gastro-intestinal et le pancréas (Figure 20).

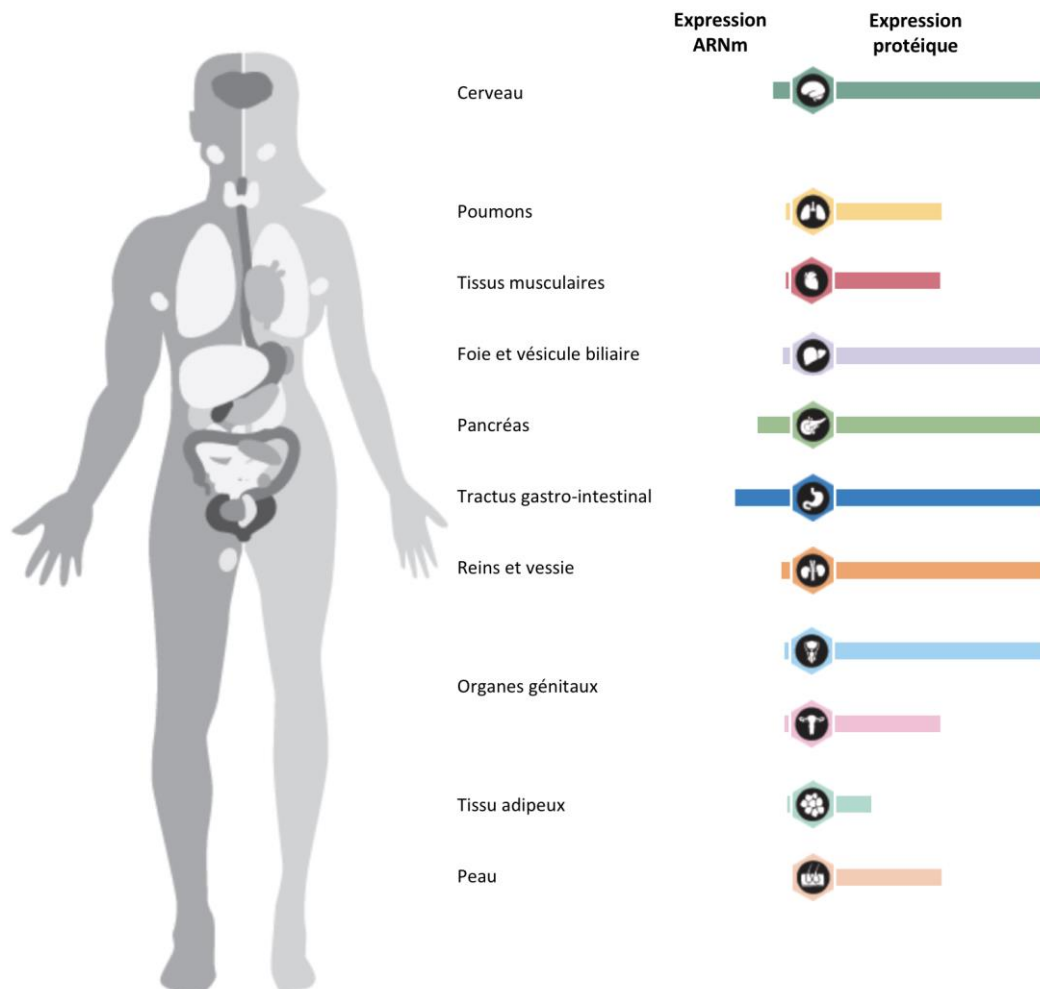


Figure 20 : Localisation tissulaire de CHAC1 chez l'homme.
(D'après <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000128965-CHAC1/tissue>).

2.1.3. Régulations de CHAC1

a) Régulation transcriptionnelle

Oh-Hashi et ses collaborateurs ont étudié, en 2013, l'activité du promoteur de *ChaC1* chez la souris. Ils ont tout d'abord montré que la séquence du promoteur de *ChaC1* chez la souris est très similaire à la séquence du promoteur de *CHAC1* chez l'homme. Ils contiennent un domaine fortement homologue autour des éléments de réponse CREB/ATF (*cAMP response*

element binding protein/activating transcription factor) et AARE (*amino acid response element*). Cette étude a montré que ces deux éléments de réponse sont essentiels à l'activité du promoteur de *ChaC1*, la perte d'un des deux éléments entraîne une réduction drastique de l'activité du promoteur de *ChaC1* et la perte simultanée des deux régions entraîne la perte totale de l'activité du promoteur de *ChaC1* (Oh-Hashi *et al.* 2013).

L'activité du promoteur de *CHAC1* chez l'homme a été étudiée quelques années plus tard par Crawford et ses collaborateurs. Ils ont pu mettre en évidence deux séquences importantes sur le promoteur de *CHAC1*, l'élément ATF/CRE (*ATF/cAMP response element*) et un élément inconnu que les auteurs ont nommé ACM (*ATF/CRE modifier element*). Par des analyses de mutations et de délétions des différents domaines, les auteurs ont pu mettre en évidence que l'élément ATF/CRE est requis pour la transcription de *CHAC1* basale et induite par un stress. L'élément ACM possède un rôle plus secondaire pour potentialiser la transcription de *CHAC1* (Crawford *et al.* 2015).

b) Régulation de la traduction et post-traductionnelle

La régulation de la traduction de la protéine CHAC1 est initiée par la séquence Kozak située dans la région 5' non traduite de l'ARNm de *CHAC1* à partir de la première méthionine. En l'absence de cette séquence, le second codon ATG de l'ARNm de *CHAC1* devient le site initiateur de la traduction d'une forme plus courte de la protéine CHAC1 (Nomura *et al.* 2016).

L'étude de Oh-Hashi a également mis en évidence une régulation post-traductionnelle de la protéine CHAC1. En effet, il a été montré que l'expression protéique de CHAC1 n'était détectable qu'en présence de MG-132, un inhibiteur du protéasome, dans une lignée cellulaire de neuroblastomes murins (Neuro2a), laissant suggérer une forte instabilité de la protéine CHAC1 et une rapide dégradation de cette dernière par le protéasome (Oh-Hashi *et al.* 2013). Il a par la suite été montré que cette régulation de CHAC1 par le protéasome ne se fait pas par une ubiquitination de la protéine CHAC1. En effet, la protéine CHAC1 est stabilisée par une surexpression d'ubiquitines (Nomura *et al.* 2016). C'est donc une autre voie que l'ubiquitination, non identifiée de nos jours, qui induit la dégradation de CHAC1 par le protéasome.

2.2. CHAC1 et stress du réticulum endoplasmique

2.2.1. Généralités sur le stress du réticulum endoplasmique

Les cellules sont constamment soumises à différents stress comme des carences en nutriments, des radiations, un stress oxydant mais aussi des infections par des agents microbiens pathogènes qui peuvent mener à des dommages et la mort cellulaire. Les cellules ont donc évolué pour développer différents mécanismes pour contrer ces stress exogènes.

La synthèse protéique est une fonction fondamentale des cellules. Le contrôle de la traduction des ARNm en protéines joue donc un rôle central dans la plupart des réponses au stress.

Chez les eucaryotes, la synthèse protéique et les modifications post-traductionnelles ont lieu dans un organelle appelé réticulum endoplasmique.

a) Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite des cellules eucaryotes, lié à la membrane nucléaire. C'est un vaste réseau tubulaire-réticulaire séparé du cytosol environnant par une membrane en bicouche lipidique (Figure 21).

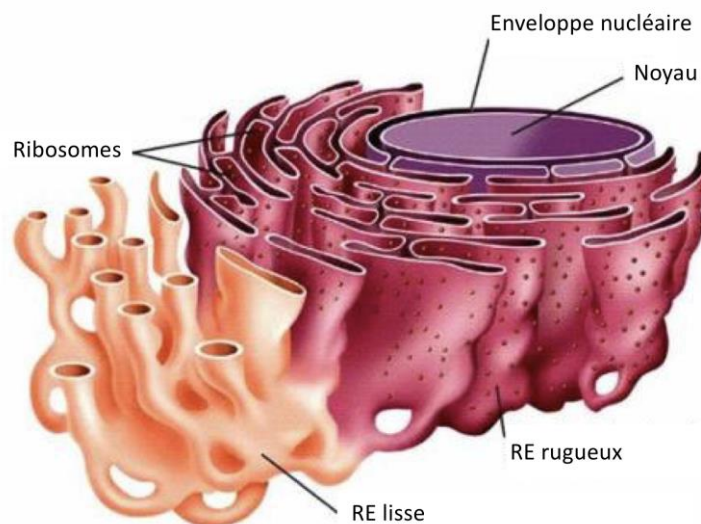


Figure 21 : Représentation schématique du réticulum endoplasmique.
(D'après <http://www.mabiologie.com/>).

La fonction principale du RE est la synthèse et le repliement des protéines transmembranaires et sécrétées (ce qui représente un tiers des protéines d'une cellule). Une partie du RE est recouverte de ribosomes qui assemblent les acides aminés en chaînes protéiques suivant l'information venue du noyau. Les ribosomes insèrent la protéine synthétisée directement dans la lumière du RE, où elles acquièrent leurs configurations grâce à des molécules chaperonnes et des modifications protéiques complexes avant de gagner l'appareil de Golgi. Le RE joue également un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie calcique dans la cellule. Un repliement et des modifications post-traductionnelles adéquates sont essentielles pour une fonction correcte des protéines. Une accumulation de protéines mal ou pas repliées ou agrégées peuvent causer un stress cellulaire et la mort de la cellule. Le repliement des protéines est donc soumis à des systèmes stringents de contrôle qualité. De nombreuses conditions environnementales peuvent déréguler le repliement des protéines et donc générer un stress du RE telles que certaines mutations génétiques, l'hypoxie, l'hypoglycémie ou d'autres anomalies métaboliques qui affectent la machinerie du RE (Marcinak et Ron 2010). Lorsque les exigences de repliement des protéines dépassent les capacités de traitement du RE, il y a une accumulation de protéines mal configurées dans la lumière du RE ce qui déclenche la voie UPR (*unfolded protein response*).

b) La voie UPR

La voie UPR a été découverte en 1988 grâce à une observation, la forte expression forcée de glycoprotéines virales mal repliées provoque la surexpression de la transcription du gène qui code pour la protéine chaperonne BiP (*binding immunoglobulin protein*) (Kozutsumi *et al.* 1988). Cette voie a donc été nommée quelques années plus tard UPR, la réponse cellulaire aux protéines mal repliées (Gething et Sambrook 1992). Les premiers composants de la voie UPR ont été identifiés par criblage génétique chez la levure au début des années 90 et, plus tard dans la décennie, la voie UPR spécifique des métazoaires a été identifiée (Marcinak et Ron 2010).

La voie UPR est activée par l'action coordonnée de trois protéines transmembranaires du RE qui sont des senseurs du stress (Figure 22) :

- IRE1 α (*inositol-requiring enzyme 1 α* ou ERN1)
- ATF6 α (*activating transcription factor 6 α*)
- PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase* ou EIF2AK3).

En conditions d'homéostasie, le domaine luminal de ces trois senseurs est maintenu dans un état inactif *via* l'association avec des protéines chaperonnes BiP (aussi connues sous le nom de GRP78 pour *glucose-regulated protein 78* ou HSPA5 pour *heat shock protein A5*). Mais les protéines BiP ont une plus forte affinité pour les protéines mal repliées donc lorsqu'il y a une accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE, BiP est dissocié des trois senseurs ce qui entraîne leur activation et des cascades de signalisation (Bertolotti *et al.* 2000).

IRE1 α

IRE1 α est une protéine transmembranaire dont la queue cytoplasmique possède deux activités enzymatiques : une activité sérine/thréonine kinase et une activité endoribonucléase (RNase). Une fois libérée des protéines BiP, IRE1 α va s'autophosphoryler et se dimériser permettant le démasquage de sa deuxième activité catalytique (Figure 22a). L'activité RNase de IRE1 α va cibler la séquence de l'ARNm qui code pour XBP1 (*X-box binding protein 1*). IRE1 α va cliver une boucle de 26 paires de bases de l'ARNm de XBP1 ce qui entraîne un décalage du cadre de lecture en enlevant un codon stop prématuré. La forme non clivée de XBP1 code pour une courte protéine instable alors que sa forme clivée code pour une protéine plus longue et fonctionnelle (Hetz 2012). XBP1 va pouvoir jouer son rôle de facteur de transcription pour induire la biosynthèse de lipides et la transcription de chaperonnes du RE permettant d'augmenter la taille et la fonction du RE. XBP1 va également induire des composants impliqués dans la voie ERAD (*endoplasmic reticulum-associated degradation*) qui dirige les protéines mal repliées vers une dégradation par le système ubiquitine-protéasome (Grootjans *et al.* 2016). L'activité RNase de IRE1 α cible également d'autres ARNm pour les dégrader dans un processus appelé RIDD (*regulated IRE1-dependent decay*).

ATF6 α

ATF6 α est une protéine transmembranaire qui, une fois libérée des protéines BiP, va transférer à l'appareil de Golgi où elle est clivée par deux enzymes S1P (*site 1 protease*) et S2P (Figure 22c) pour produire un fragment cytosolique qui va migrer dans le noyau et activer l'expression de gènes codant pour des protéines capables d'augmenter la capacité du RE et le repliement des protéines (XBP1, BiP) et d'activer la voie ERAD (Grootjans *et al.* 2016).

PERK

De même que pour IRE1 α , la dissociation de BiP du domaine luminal de PERK permet l'homodimérisation de PERK et son autophosphorylation pour activer son domaine kinase cytoplasmique (Figure 22b). Une fois activé, PERK va phosphoryler eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2 α*) sur la sérine 51. eIF2 α peut également être activé par d'autres kinases dans des conditions de stress autre que le stress du RE (Grootjans *et al.* 2016). eIF2 α phosphorylé va permettre la traduction sélective de l'ARNm de ATF4 (*activating transcription factor 4*) qui va activer des gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés, la résistance au stress oxydant et l'autophagie (Harding *et al.* 2000). eIF2 α va former un complexe tertiaire au niveau de la petite sous unité du ribosome pour permettre l'initiation de la traduction. Lorsque eIF2 α est phosphorylé par PERK, la fixation de eIF2 α au ribosome est inhibée, il y a donc une réduction de la quantité d'ARNm traduits et donc de protéines qui entrent dans le RE (Grootjans *et al.* 2016). Le blocage permanent de la traduction n'étant pas compatible avec la survie cellulaire, il y a un rétrocontrôle de la phosphorylation de eIF2 α . ATF4 va induire GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein*) qui va déphosphoryler eIF2 α pour restaurer la traduction des protéines (Connor *et al.* 2001). Cependant, ATF4 active aussi la transcription de CHOP (*C/EBP homologous protein* ou DDIT3) qui est un facteur pro-apoptotique (Marciniak *et al.* 2004). ATF4 et CHOP fonctionnent ensemble en hétérodimère pour induire l'apoptose en augmentant la synthèse protéique ce qui augmente le mauvais repliement des protéines, le stress oxydant et la mort cellulaire (Han *et al.* 2013).

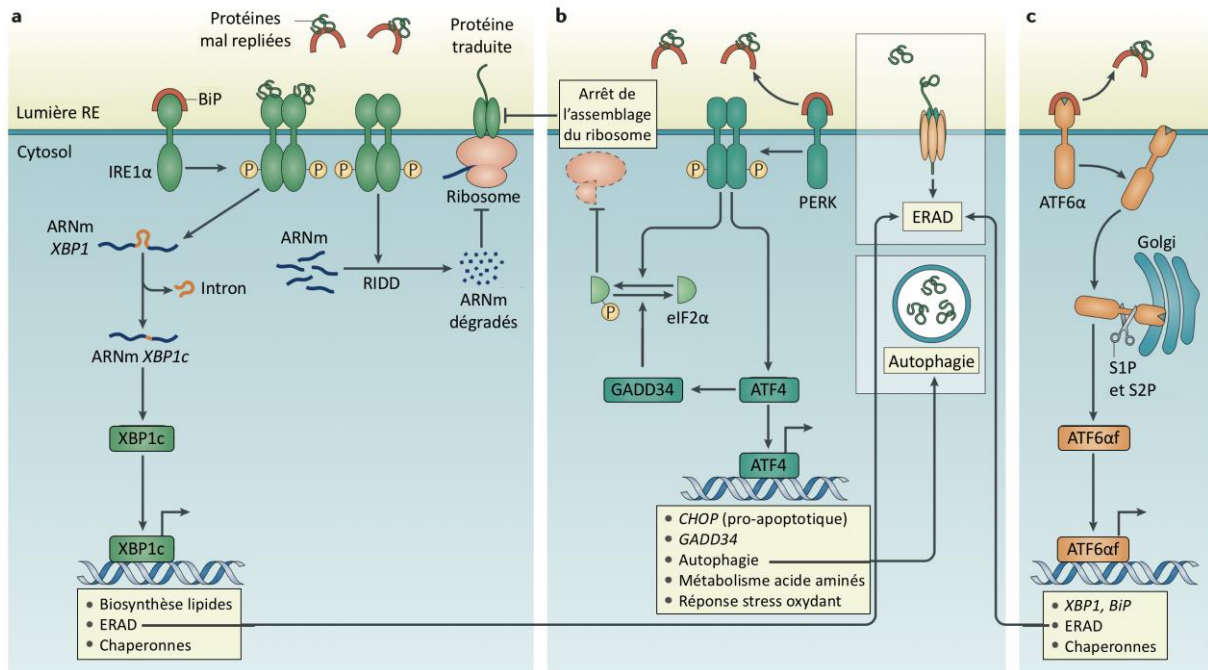


Figure 22 : Description schématique de la voie UPR du stress du RE.

(a) Voie IRE1 α : lorsque BiP est dissocié de IRE1 α , ce dernier se dimérise et s'autophosphoryle. IRE1 α va entraîner le clivage de l'ARNm de XBP1 et la traduction d'une protéine XBP1c (XBP1c : XBP1 clivé) fonctionnelle impliquée dans la biosynthèse des lipides, la voie ERAD et la transcription de chaperonnes du RE. IRE1 α dégrade également d'autres ARNm *via* le processus RIDD. (b) Voie PERK : la dissociation de BiP de PERK va entraîner la phosphorylation de eIF2 α et l'activation du facteur ATF4 impliqué dans la transcription du facteur pro-apoptotique CHOP, l'autophagie, le métabolisme des acides aminés et la réponse au stress oxydant. Il y a également un rétrocontrôle négatif de cette voie *via* GADD34. (c). Voie ATF6 α : une fois libérée de BiP, ATF6 α va transférer vers le Golgi ou elle sera clivée par deux enzymes pour libérer un fragment cytosolique, ATF6 α f, actif permettant l'activation de la voie ERAD et la transcription de XBP1, de BiP et de chaperonnes.

(D'après Grootjans et al. 2016).

Les programmes transcriptionnels engendrés par la voie UPR ont pour but premier de restaurer la protéostasie (homéostasie protéique). Quand les mécanismes mis en jeu pour rétablir la protéostasie échouent ou lors d'un stress du RE chronique, les voies UPR évoluent vers un mode pro-apoptotique (Hetz 2012).

2.2.2. CHAC1 est un composant de la voie UPR

En 2006, Gargalovic et ses collaborateurs effectuent, dans le contexte de l'athérosclérose, un transcriptome de cellules primaires humaines endothéliales aortiques (HAEC pour *human aortic endothelial cells*) traitées par de l'ox-PAPC (*oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-3-*

glycero-phosphorylcholine), un phospholipide oxydé pro-inflammatoire qui bloque la signalisation du LPS en bloquant TLR4 (Gargalovic *et al.* 2006). Cette étude a permis de mettre en évidence que les gènes de la voie UPR sont surexprimés en réponse à la stimulation par l'ox-PAPC. Un gène, en plus de ceux appartenant à la voie UPR, les a particulièrement intéressés, il s'agit de *CHAC1* (noté *MGC4504* dans leur étude). Leurs études de corrélation ont montré une forte connectivité de *CHAC1* avec les gènes de la voie UPR. De plus, YER163c, l'homologue de *CHAC1* chez la levure a déjà été identifié comme induit par l'activation de la voie UPR (Travers *et al.* 2000). Ils ont également montré que l'induction chimique de la voie UPR par de la tunicamycine (TM, inhibe les N-glycosylations des protéines) ou du DTT (dithiothréitol, réduit les ponts disulfure) entraînait une augmentation de l'expression de l'ARNm de *CHAC1*. Ils ont aussi observé que ATF4, un membre de la voie UPR médiée par PERK, était un médiateur nécessaire pour l'expression de *CHAC1* par des approches de siRNA (*small interference RNA*) et de surexpression à l'aide d'un plasmide.

C'est en 2009, que Mungrue et ses collaborateurs identifient réellement *CHAC1* comme un composant de la voie UPR initiée par PERK (Mungrue *et al.* 2009). En effet, ils ont montré que différents inducteurs chimiques du stress du RE tels que la thapsigargine (Tg) ou la TM mais pas d'autres inducteurs de stress cellulaire en général tels qu'un choc thermique ou un traitement par les UV sont capable d'induire une augmentation de l'expression de l'ARNm de *CHAC1*. *CHAC1* est donc bien un nouveau composant de la voie du stress du RE et de la voie UPR. Ils ont également montré que *CHAC1* est dépendant de la voie PERK/ATF4 uniquement. En effet, lorsque les voies IRE1 α (modulation de XBP1) et ATF6 α (modulation de BiP) sont inhibées, il y a toujours une stimulation de *CHAC1* par la TM alors que ce n'est pas le cas lorsque c'est ATF4 qui est modulé. Ceci a été confirmé par une étude ultérieure de la même équipe (Romanoski *et al.* 2011). *CHAC1* est donc induit en aval de ATF4 dans la voie PERK et également en aval de CHOP. En effet, il a été montré que lorsque l'on bloque CHOP, il y a une diminution de l'induction de *CHAC1* par la TM. De plus, lorsque *CHAC1* est inhibé par une stratégie de siRNA, il n'y a pas de variation de l'expression des facteurs ATF4, CHOP et BiP, *CHAC1* est bien en aval de ces composants dans la voie PERK (Figure 23).

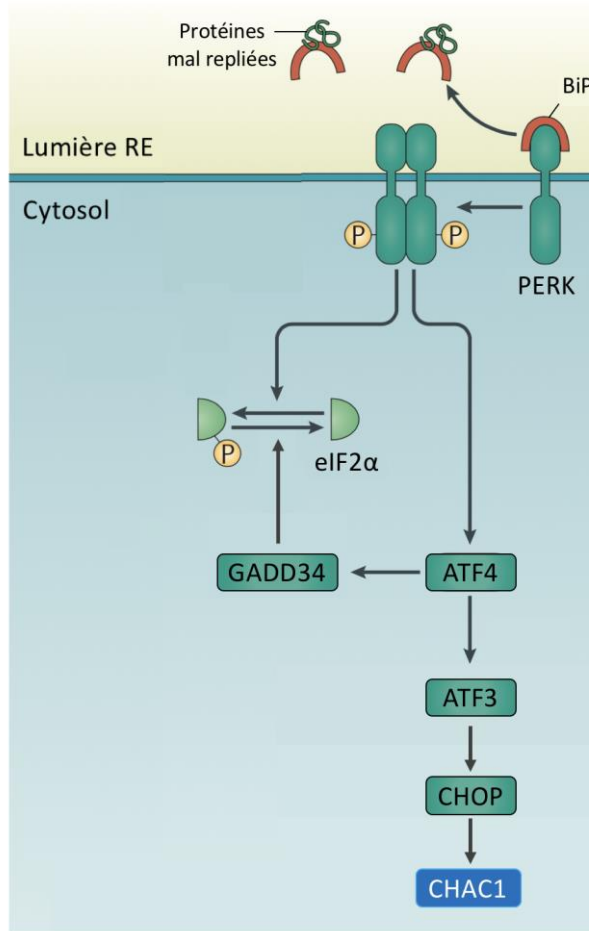


Figure 23 : CHAC1 dans la voie UPR initiée par PERK. CHAC1 est un composant de la voie PERK de l'UPR en aval du facteur pro-apoptotique CHOP. (D'après Mungrue et al. 2009, Grootjans et al. 2016).

2.2.3. Stress du réticulum endoplasmique et mucoviscidose

Dans le contexte de la mucoviscidose, beaucoup de facteurs peuvent avoir un impact sur la protéostasie des cellules CF et induire un stress du RE, notamment l'accumulation de protéines CFTR mutées mal conformées pour être dégradées (Gilbert *et al.* 1998), l'infection chronique ou encore le stress oxydant (Chen *et al.* 2008).

La littérature n'est cependant pas unanime et les données sont contradictoires concernant l'induction du stress du RE et de la voie UPR dans les cellules CF. En 2006, Nanua et ses collaborateurs montrent une différence d'induction de la voie UPR entre des cellules contrôle et des cellules CF. En effet, ils ont observé dans les cellules primaires pulmonaires humaines CF, une induction (en réponse à un inducteur chimique du stress du RE) du facteur XBP1

reflétant une induction de la voie IRE1 α mais pas de phosphorylation de PERK et eIF2 α suggérant une défaillance de la voie PERK, à l'inverse de cellules primaires pulmonaires humaines saines qui présentent une induction classique de la voie UPR (Nanua *et al.* 2006). De façon contradictoire, en 2007, une autre équipe a montré une induction du stress du RE par la Tg identique entre la lignée de cellules nasales humaines CF15 normales et infectées par un adénovirus contenant le CFTR muté F508del (Hybiske *et al.* 2007).

En 2012, Blohmke et ses collaborateurs ont montré une activation atypique de la voie UPR (Blohmke *et al.* 2012). En effet, ils ont étudié le profil d'expression des gènes de deux lignées de cellules épithéliales des voies aériennes CF et non-CF, les IB3-1 (cellules hétérozygotes pour les mutations F508del et W1282X de *CFTR*) et les cellules C38 (IB3-1 transfectées avec *CFTR* par adénovirus) stimulées ou non par de la flagelline de *P. aeruginosa*. Ils ont montré que les gènes du stress du RE et de la réponse immunitaire innée sont significativement différents entre les deux lignées. Ils ont ensuite montré qu'il y a une induction de la voie IRE1 α (augmentation de XBP1) mais pas de la voie PERK (pas d'induction des facteurs ATF4, CHOP, GADD34 et BiP) dans les cellules CF. Leurs résultats ont été validés dans trois modèles CF (cellules épithéliales des voies aériennes CF et contrôle immortalisées, cellules mononuclées du sang périphérique primaires de patients CF ou de donneurs sains et tissus pulmonaires primaires CF et contrôle). Ils ont donc montré que la voie PERK est inactive dans les cellules épithéliales CF. Il s'agit bien d'un défaut d'activation et non pas d'une déficience de la voie PERK dans ces cellules, puisque l'induction du stress du RE par un agent chimique, la TM, entraîne l'induction de toutes les voies de l'UPR dans les cellules CF.

Blohmke et ses collaborateurs ont également fait l'hypothèse que le stress du RE et les voies de l'UPR dans les cellules CF contribuent à la réponse inflammatoire exacerbée observée chez les patients atteints de mucoviscidose (Blohmke *et al.* 2012). En effet, le stress du RE est impliqué dans de nombreuses pathologies inflammatoires comme par exemple les maladies métaboliques, les maladies inflammatoires de l'intestin ou encore les maladies neurodégénératives (Grootjans *et al.* 2016). Il existe une régulation réciproque entre le stress du RE et l'inflammation. Le stress du RE peut initier directement des voies de l'inflammation et des stimuli pro-inflammatoires (ROS, TLR, cytokines) peuvent activer le stress du RE, ainsi la réponse UPR peut amplifier les réponses inflammatoires (Figure 24).

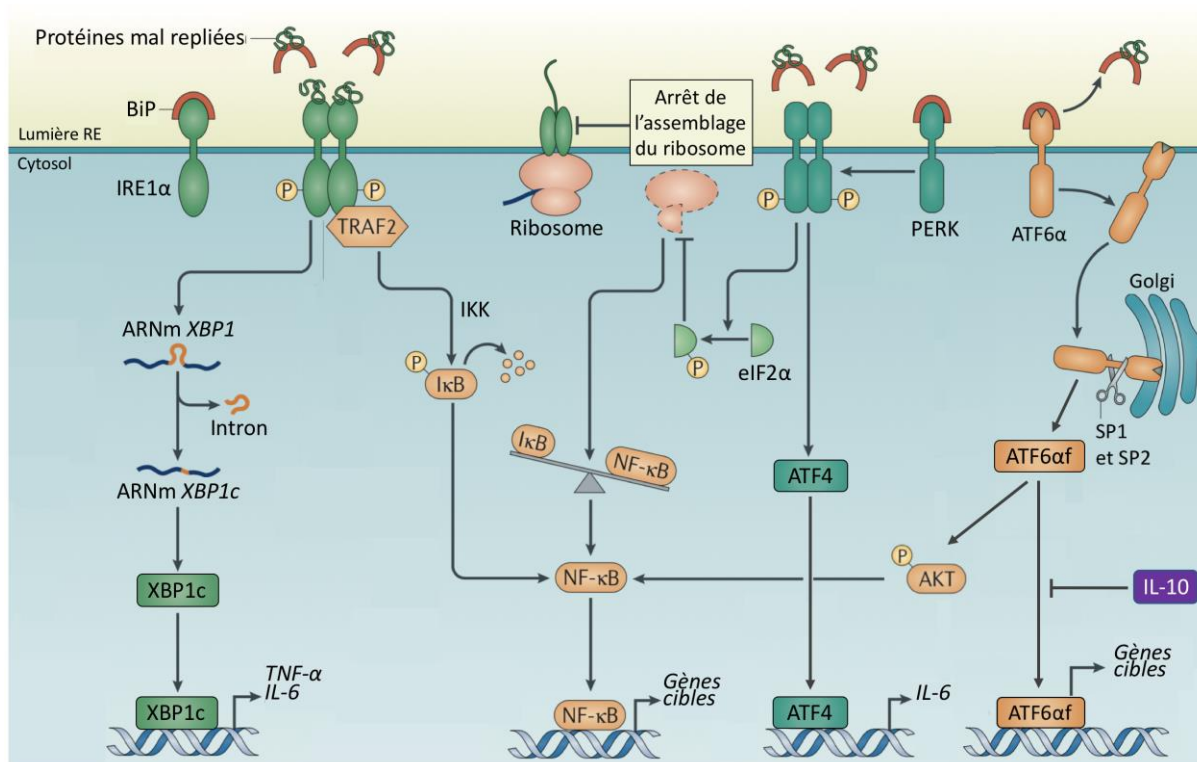


Figure 24 : UPR et inflammation.

Le facteur XBP1c (XBP1 clivé) induit par la voie IRE1 α lie les promoteurs de l'IL-6 et du TNF- α et ATF4 induit par la voie PERK lie le promoteur de l'IL-6. Le facteur de transcription NF- κ B est activé par l'interaction de IRE1 α avec TRAF2 induisant un recrutement de IKK qui va phosphoryler I κ B entraînant la libération de NF- κ B. L'arrêt de la synthèse protéique augmente le ratio NF- κ B/I κ B en faveur de NF- κ B. ATF6 α f (fragment cytosolique de ATF6 α) induit la phosphorylation de AKT pour activer NF- κ B. La cytokine anti-inflammatoire IL-10 bloque la translocation de ATF6 α f vers le noyau. (D'après Grootjans *et al.* 2016).

Il a été montré que l'activation pharmacologique de la voie PERK par le salubrinal (inhibe GADD34 ce qui augmente eIF2 α phosphorylé) atténue la réponse inflammatoire (sécrétion d'IL-6) en réponse à la flagelline de *P. aeruginosa* impliquant la voie p38 MAPK. De plus, l'induction du stress du RE par la TM potentialise la sécrétion d'IL-6 par rapport à la réponse observée avec la flagelline de *P. aeruginosa* (Blohmke *et al.* 2012). Par ailleurs, les trois voies de l'UPR impactent sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Grootjans *et al.* 2016, Smith 2018) (Figure 24). NF- κ B est activé par l'interaction de IRE1 α avec la protéine TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) en réponse au stress du RE ce qui induit le recrutement de IKK (*I κ B kinase*) qui va phosphoryler et dégrader I κ B permettant ainsi la libération de NF- κ B qui peut transloquer dans le noyau (Hu *et al.* 2006). La voie PERK bloque la synthèse globale des protéines ce qui va induire une augmentation du ratio NF- κ B/I κ B en faveur de NF- κ B (demie vie plus courte de I κ B) permettant la transcription de NF- κ B (Deng *et al.* 2004). En

réponse à l'infection bactérienne, ATF6 α induit la phosphorylation de AKT (ou PKB pour *protein kinase B*) pour activer NF- κ B (Yamazaki *et al.* 2009). L'activation de la réponse UPR va entraîner l'induction et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α (Grootjans *et al.* 2016). Dans les macrophages, il a été montré que XBP1 va se lier aux promoteurs de l'IL-6 et du TNF- α (Martinon *et al.* 2010) et ATF4 lie le promoteur de l'IL-6 (Iwasaki *et al.* 2014). Certaines cytokines sont également capables de réguler la voie UPR. L'IL-10, par exemple, peut inhiber l'inflammation induite par le stress du RE en bloquant la translocation de ATF6 α clivé dans le noyau (Shkoda *et al.* 2007) (Figure 24).

Le lien entre stress du RE et inflammation dans le contexte de la mucoviscidose reste un sujet relativement controversé mais de nombreuses études penchent tout de même en faveur d'un rôle du stress du RE dans l'inflammation précoce et chronique retrouvée chez les patients atteints de mucoviscidose.

2.3. CHAC1 et apoptose

2.3.1. Généralités sur l'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus physiologique par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. C'est l'une des voies possibles de la mort cellulaire qui est génétiquement programmée et nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. *Apoptosis* est un mot qui vient du grec signifiant la chute, les cellules en apoptose se détachent de leurs voisines comme les feuilles qui tombent des branches en automne.

L'apoptose, mort cellulaire ordonnée est opposée à la nécrose qui est un phénomène désordonné, pathologique, inflammatoire et touchant le tissu dans son ensemble. C'est un phénomène rapide (quelques heures) qui ne laisse pas de traces dans les tissus. L'apoptose se manifeste particulièrement lors du développement d'un organisme, d'un remodelage tissulaire, d'une réaction inflammatoire ou lors de lésions tissulaires.

L'apoptose est constituée de deux voies principales d'activation :

- une voie dite extrinsèque, elle implique des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs TNF
- une voie dite intrinsèque, mettant en jeu la mitochondrie, cette voie est gouvernée par les protéines de la superfamille Bcl-2.

Ces deux voies vont conduire à l'activation de protéases à cystéines, les caspases. Celles-ci jouent un rôle essentiel en dégradant de nombreuses protéines nécessaires à la survie de la cellule. Les caspases dites effectrices sont responsables du clivage de plusieurs protéines de structure ce qui se traduit par des phénomènes morphologiques et biochimiques caractéristiques tels que la rétraction de la cellule, le bourgeonnement de la membrane cellulaire, une perte de polarisation de la cellule avec l'exposition de phosphatidylsérines au niveau du feuillet externe de la bicouche lipidique de la membrane cellulaire, un arrêt de la réplication, une fragmentation du noyau et du cytosquelette, un clivage de l'ADN nucléaire aboutissant à la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques qui sont phagocytés par les macrophages ou les cellules voisines (Figure 25).

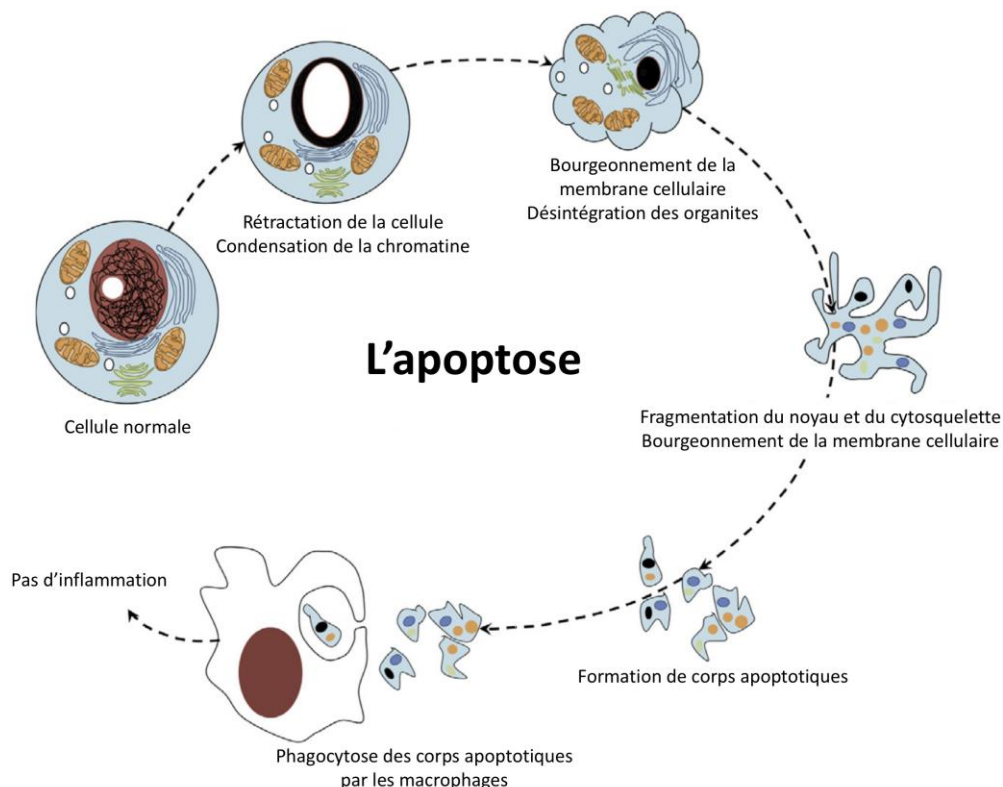


Figure 25 : Changements morphologiques et biochimiques lors de l'apoptose d'une cellule. Une cellule qui entre en apoptose va se rétracter, sa chromatine se condense, sa membrane cellulaire commence à bourgeonner, ses organites se désintègrent, le noyau et le cytosquelette se fragmentent pour former des corps apoptotiques qui seront phagocytés par les macrophages. (D'après Abou-Ghali et Stiban 2015).

L'apoptose *via* ces deux voies, se déroule en trois phases :

- une phase d'induction : réception des signaux inducteurs de l'apoptose
- une phase effectrice : intégration de ces signaux, franchissement d'un point de non-retour, activation des caspases
- une phase de destruction : dégradation de la cellule, élimination des corps apoptotiques.

a) Voie extrinsèque

La voie extrinsèque de l'apoptose est activée comme son nom l'indique par un signal extérieur à la cellule. Elle est activée par les récepteurs de la famille TNF, notamment, le récepteur Fas (ou APO-1 ou CD95) et les récepteurs TNF1 et TNF2 (Martin *et al.* 2005, Henson et Tuder 2008) (Figure 26). Les récepteurs Fas et TNF possèdent un domaine cytoplasmique appelé domaine de la mort (*death domain*). Les récepteurs Fas sont activés par la liaison à leur ligand, FasL présent à la surface des lymphocytes T cytotoxiques (LTc) ou soluble (clivé de la membrane des LTc par des métalloprotéinases ou relargué par les monocytes sanguins). Le ligand FasL peut être reconnu par d'autres récepteurs tels que TNFRSF6B (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 6B* ou DcR3 pour *decoy receptor 3*) ce qui a pour effet d'inhiber la signalisation par les récepteurs de l'apoptose. Lorsque Fas se lie à son ligand, la structure biochimique de son domaine cytoplasmique est reconnue par des protéines d'association appelées FADD (*Fas associated death domain*). Les protéines FADD vont alors recruter la pro-caspase-8. La formation de ce complexe protéique entraîne, le clivage autocatalytique de la pro-caspase-8 en caspase-8 qui est relarguée dans le cytosol sous forme active. La caspase-8 va induire l'activation en cascade de caspases effectrices, notamment les caspases-3 et 7 entraînant le clivage de l'ADN nucléaire et la mort cellulaire.

Parmi les mécanismes engendrés par les caspases effectrices, il y a par exemple le clivage de PARP (poly(ADP-ribose) polymérase). Cette enzyme, localisée dans le noyau cellulaire a pour fonction de signaler l'ADN monocaténaire au système enzymatique chargé de restaurer un ADN bicaténaire. PARP se lie aux fragments d'ADN monocaténaires et commence la synthèse d'une chaîne de poly(ADP-ribose) comme signal pour les enzymes de réparation de l'ADN. Le clivage de PARP par les caspases-3 et 7 entraîne son inactivation.

b) Voie intrinsèque

Par opposition à la voie extrinsèque, la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) est induite par des signaux internes à la cellule. Par exemple, cette voie peut être activée par un effet génotoxique (compromission de l'intégrité du génome), un stress oxydant, des rayons UV ou encore des radiations gamma (Henson et Tuder 2008). L'activation de cette voie entraîne une interruption du métabolisme énergétique de la mitochondrie, il y a une rupture ou ouverture de la mitochondrie, ce qui permet la libération dans le cytosol de molécules pro-apoptotiques normalement mitochondriales, telles que le cytochrome c, le facteur AIF (*apoptosis inducing factor*) ou les protéines Bax et Bak (Figure 26). Une fois cytosoliques, les facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux vont avoir des cibles et des effets spécifiques. Le cytochrome c va permettre le recrutement de la pro-caspase-9 et APAF1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*) pour former un complexe appelé apoptosome (Martin *et al.* 2005). La caspase-9 activée au sein de ce complexe va permettre l'activation de caspases effectrices notamment la caspase-3. Le facteur AIF est redistribué vers le cytosol puis vers le noyau cellulaire pour induire la mort par apoptose de façon indépendante des caspases. La voie mitochondriale peut également être activée par la caspase-8, responsable du clivage de la protéine BID qui interagit et active directement Bax et Bak afin d'amplifier le signal apoptotique.

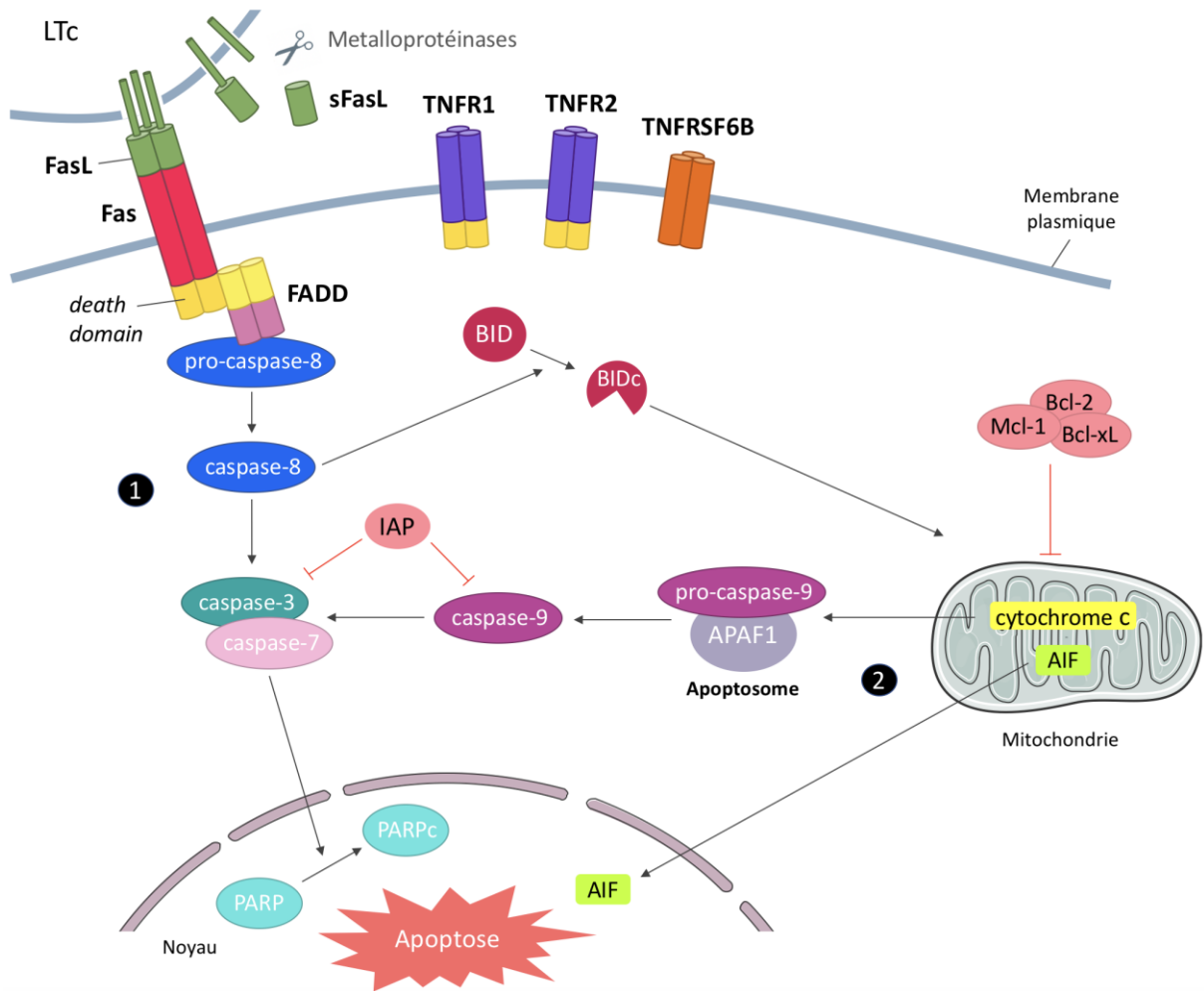


Figure 26 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

(1) Voie extrinsèque : elle est initiée par les récepteurs Fas et de la famille TNF en réponse à un signal extérieur à la cellule. Cette voie est gouvernée par l'action en cascades de caspases effectrices entraînant le clivage de l'ADN nucléaire et la mort cellulaire. (2) Voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) : elle est initiée par des signaux internes à la cellule et va permettre la libération de molécules pro-apoptotiques normalement mitochondriales telles que le cytochrome c qui va induire des caspases effectrices et la mort cellulaire ou le facteur AIF qui va induire la mort cellulaire par apoptose indépendamment des caspases.

(sFasL : FasL soluble, PARPc : PARP clivé, BIDc : BID clivé).

(D'après Martin *et al.* 2005).

L'apoptose est un mécanisme finement régulé et contrôlé. Il existe des protéines appelées IAP (*inhibitor of apoptosis*) qui lie les caspases-3, 7 et 9 en conditions anti-apoptotiques pour les inhiber. Les protéines Bax et Bak pro-apoptotiques sont inhibées par liaison avec les protéines mitochondriales anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 (Figure 26).

L'apoptose permet d'éliminer les cellules non désirées ou endommagées pour un maintien de l'homéostasie tissulaire.

2.3.2. CHAC1, protéine pro-apoptotique

L'étude de Mungrue et ses collaborateurs de 2009 qui a identifié CHAC1 comme un membre de la voie UPR du stress du RE, s'est également intéressée à la recherche des cibles de CHAC1 (Mungrue *et al.* 2009). Ils ont effectué une analyse des gènes modulés des cellules HAEC transfectées avec un siRNA de CHAC1 et stimulées par de la TM. Les auteurs ont pu identifier 227 gènes différentiellement exprimés entre les cellules HAEC traitées par le siRNA de CHAC1 et la TM et les cellules HAEC traitées avec un siRNA contrôle et la TM. Parmi ces gènes, les auteurs se sont concentrés sur ceux probablement impliqués dans des voies déjà connues. Ils ont pu de cette manière identifier TNFRSF6B comme une cible de CHAC1. L'expression de TNFRSF6B est augmentée lorsque CHAC1 est inhibé mais pas lorsque la voie UPR est induite chimiquement. TNFRSF6B est donc inhibé par CHAC1 en conditions contrôle probablement par une voie indépendante de la voie UPR du stress du RE. Les auteurs ont pu mettre en évidence qu'une augmentation de l'expression de CHAC1 à l'aide d'un plasmide de surexpression entraîne une augmentation du marquage TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) qui détecte la fragmentation de l'ADN, une augmentation de la forme clivée du facteur PARP et une augmentation de la translocation du facteur AIF dans le noyau. De façon opposée, l'inhibition de CHAC1 par siRNA spécifique entraîne une diminution de ces marqueurs de l'apoptose (Mungrue *et al.* 2009). Cette étude a donc montré que CHAC1 est une protéine pro-apoptotique, nécessaire et suffisante pour induire de l'apoptose. Différents mécanismes ont été proposés dans la littérature pour contribuer à l'apoptose induite en réponse à l'activation de la voie UPR du stress du RE. La caspase-12 a été proposée comme activée en réponse à une induction de la voie UPR, entraînant l'activation de la caspase-3 chez la souris (Morishima *et al.* 2002), mais cette protéine n'est pas fonctionnelle chez l'humain (Fischer *et al.* 2002). CHOP est une protéine pro-apoptotique, cependant les mécanismes en aval de CHOP ne sont pas complètement caractérisés. Des données de la littérature indiquent que CHOP pourrait agir en inhibant Bcl-2 (McCullough *et al.* 2001) ou en activant Bax (Gotoh *et al.* 2004). Ces données sont consistantes avec l'étude de Mungrue (Mungrue *et al.* 2009) et suggèrent que le clivage de PARP et la translocation de AIF sont des événements associés à l'induction de l'apoptose dépendante de CHOP. CHAC1 est donc une cible en aval de la voie PERK-ATF4-CHOP qui favorise l'apoptose.

Différentes études ont confirmé le rôle de CHAC1 comme protéine pro-apoptotique dans différents contextes. Dans certains types de cancer, CHAC1 a été montré comme augmenté en réponse à des drogues favorisant l'apoptose (Joo *et al.* 2012, Joo *et al.* 2015, Chen *et al.* 2017). L'étude de Joo et ses collaborateurs en 2015 a également suggéré que l'augmentation de CHAC1 observée dans une lignée de cellules humaines de leucémie lymphoblastique T en réponse au farnésol, une drogue anti-cancéreuse, induisait une réponse apoptotique indépendamment du facteur Bcl-2 (Joo *et al.* 2015). CHAC1 a aussi été associé à une induction de l'apoptose dans un modèle cellulaire de cataracte (Zhou *et al.* 2016).

2.3.3. Apoptose et mucoviscidose

Dans le contexte de la mucoviscidose, différents phénomènes peuvent induire des mécanismes d'apoptose. Les cycles d'infection et d'inflammation présents dans les cellules CF entraînent un défaut d'éradication des pathogènes ce qui est associé à un défaut de clairance des cellules apoptotiques et à une susceptibilité variable à la mort cellulaire programmée. Le statut pro-inflammatoire chronique et pro-infectieux des cellules CF entraîne une accumulation des cellules apoptotiques dans les tissus. D'autre part, les voies aériennes des patients CF présentent une augmentation de la production de ROS ce qui est responsable de modifications de certaines réponses cellulaires entraînant l'apoptose (Soleti *et al.* 2013). De plus, les mutations de *CFTR* vont entraîner une rétention des protéines CFTR mutées dans le RE, ce qui représente un signal de stress pour les cellules (Bartoszewski *et al.* 2008) induisant l'activation de la voie UPR du stress du RE (Kerbirou *et al.* 2007). Les cycles chroniques d'inflammation et d'infection présents chez les patients CF peuvent également induire l'activation de cette voie UPR. Il a été proposé que l'activation de différentes voies de l'UPR dans le contexte de la mucoviscidose pourrait contribuer à l'induction de l'apoptose (Kerbirou *et al.* 2007). Les cellules épithéliales CF présentent donc une grande réactivité à l'apoptose et simultanément un défaut de clairance des cellules apoptotiques.

Les cellules épithéliales CF présentent un stress du RE accentué et des changements dans leur sécrétome, de ce fait, la relation exacte entre CFTR et apoptose est difficile à établir. La littérature concernant la susceptibilité des cellules CF à entrer en apoptose présente des données contradictoires selon le type cellulaire étudié (cellules épithéliales d'origine

bronchique, trachéale ou pancréatique) ainsi que selon l'inducteur de l'apoptose utilisé (apoptose basale ou apoptose induite par un agent chimique ou un agent infectieux). Une des premières études date de 1997 et a montré que des biopsies bronchiques et intestinales de patients CF ont plus de cellules apoptotiques détectées par un marquage TUNEL par rapport aux biopsies contrôle et l'apoptose est particulièrement prononcée dans les zones où CFTR est fortement exprimé comme dans les cellules sous muqueuses par rapport à des zones où CFTR est moins exprimé comme dans l'estomac (Maiuri *et al.* 1997). Les cellules CF montrant une augmentation de la fragmentation de l'ADN par rapport aux cellules contrôle ne présentent pas de modifications morphologiques ce qui montre que le processus d'apoptose est initié mais qu'il échoue par la suite. De plus, la fragmentation de l'ADN observée dans les cellules CF n'est pas due à une inflammation locale absente des tissus évalués. Cette étude de 1997 a donc montré une perturbation des voies de la mort cellulaire programmée dans les cellules épithéliales CF d'origine bronchiques et intestinales. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Durieu et ses collaborateurs qui ont montré une intense fragmentation de l'ADN associée à une surexpression de FasL dans des cellules épithéliales bronchiques CF issues de biopsies (Durieu *et al.* 1999). Une autre étude des années 2000 a montré que les cellules épithéliales CF trachéales et pancréatiques sont plus sensibles à l'apoptose induite par un agent chimique (la staurosporine) mais pas à l'apoptose basale par rapport aux cellules contrôle (Rottner *et al.* 2007). La susceptibilité des cellules CF à l'apoptose est directement associée à l'incapacité du CFTR muté à être recruté à la membrane plasmique. Le recrutement de CFTR à la membrane permettrait l'abolition de l'apoptose (Soleti *et al.* 2013). Chez les patients CF, des niveaux élevés d'apoptose ont également été observés dans les cellules épithéliales infectées chroniquement par des pathogènes, ce qui suggère que l'apoptose présente au niveau de l'épithélium alvéolaire pourrait être due à la présence d'infections chroniques plutôt qu'à la déficience de CFTR (Yalcin *et al.* 2009). Il a de plus été proposé que les différences des niveaux d'apoptose observés entre les cellules CF et les cellules contrôles pourraient être dues aux conséquences de la dysfonction de CFTR et au manque d'acidification des compartiments cytoplasmiques requise pour l'activité protéolytique et la fonction des caspases (Gottlieb et Dosanjh 1996).

Les cellules épithéliales issues de patients atteints de mucoviscidose semblent être plus susceptibles à l'apoptose que des cellules saines exprimant CFTR. L'apoptose exagérée décrite

dans les cellules épithéliales CF pourrait être due aux mutations de *CFTR* elles-mêmes, à son accumulation dans le RE, au statut pro-inflammatoire et pro-infectieux des cellules CF et à une dysfonction des cellules épithéliales responsable de divers événements pathologiques dans la mucoviscidose.

2.4. CHAC1 et métabolisme du glutathion

2.4.1. Le métabolisme du glutathion

a) Le glutathion

Le glutathion a été découvert en 1888 (De Rey Pailhade 1888) mais c'est seulement en 1929 que la composition du glutathion comme tripeptide de glutamate, cystéine et glycine est identifiée (Hopkins 1929) et sa structure finale comme γ -glutamyl-cystéinyglycine a été déterminée quelques années plus tard (Harington et Mead 1935) (Figure 27). Les différents composants du glutathion sont reliés par des liaisons peptidiques γ -glutamyl ce qui confère au glutathion une stabilité exceptionnelle, une insensibilité à de nombreuses peptidases cellulaires et une dégradation caractéristique par des enzymes spécifiques (Bachhawat et Kaur 2017).

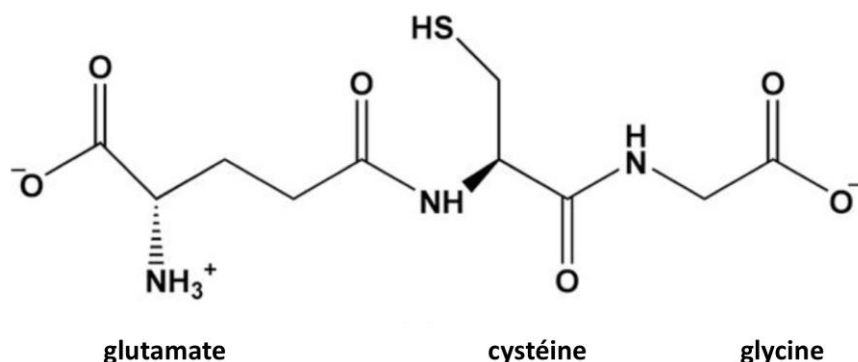


Figure 27 : Structure du glutathion.
Le glutathion est un tripeptide de glutamate, cystéine et glycine.
(D'après Liu *et al.* 2014).

Le glutathion est le thiol de bas poids moléculaire prédominant dans les cellules animales. Le glutathion est retrouvé le plus souvent sous sa forme réduite, le GSH qui peut être oxydé en

disulfure de glutathion ou GSSG. Presque 90 % du GSH intracellulaire est retrouvé dans le cytosol, 10 % dans la mitochondrie et un faible pourcentage dans le RE. À l'exception de l'acide biliaire qui peut contenir jusqu'à 10 mmol/L de GSH, les concentrations extracellulaires en GSH sont relativement faibles (2-20 μ mol/L dans le plasma) (Wu *et al.* 2004).

Le glutathion est un métabolite essentiel chez les eucaryotes. En l'absence de biosynthèse de glutathion, il a été observé une létalité embryonnaire chez la souris. De la même manière, chez la levure, en absence de glutathion, il y a un arrêt de la croissance (Bachhawat et Yadav 2018). L'homéostasie du glutathion est maintenue par la régulation de sa biosynthèse, son transport, son efflux, sa consommation et sa dégradation. Le métabolisme du glutathion est régulé par le cycle γ -glutamyl.

b) Le cycle γ -glutamyl

Orlowski et Meister ont montré en 1970 que le glutathion participait au cycle γ -glutamyl qui permet l'entrée ATP-dépendante d'acides aminés dans les cellules grâce à la synthèse et à la dégradation du GSH (Orlowski et Meister 1970).

Les deux premières étapes du cycle γ -glutamyl concernent la biosynthèse de glutathion. Elle est gouvernée par deux enzymes : la γ -glutamyl-cystéine synthase (GCS) qui produit la γ -glutamyl-cystéine à partir de glutamate et de cystéine *via* une réaction dépendante de l'ATP et la glutathion synthétase (GS) qui produit la γ -glutamyl-cystéinyl-glycine ou glutathion dans une seconde réaction ATP-dépendante impliquant la γ -glutamyl-cystéine et la glycine. Le glutathion formé peut être dégradé par les enzymes de la famille γ -glutamylcyclotransférase (γ -GCT) pour former l'acide pyroglutamique ou 5-oxoproline et la cystéinyl-glycine par hydrolyse du glutathion. La 5-oxoproline formée est clivée par la 5-oxoprolinase pour produire du glutamate, tandis que la cystéinyl-glycine est clivée par des cys-gly peptidases spécifiques pour produire de la cystéine et de la glycine. Le glutamate, la cystéine et la glycine ainsi libérés peuvent, si besoin, être réinvestis dans la biosynthèse de glutathion (Bachhawat et Yadav 2018) (Figure 28). Lorsque le cycle γ -glutamyl est décrit en 1970, les enzymes de la famille γ -GCT ne sont pas encore connues. Orlowski et Meister propose alors une dégradation du glutathion par l'unique enzyme connue à ce moment, la γ -glutamyl-transpeptidase (GGT). La GGT a une activité de transpeptidation, c'est l'unique enzyme localisée sur la surface externe des cellules épithéliales qui permet le transfert d'un résidu γ -glutamyl à partir de peptides

γ -glutamyl comme le glutathion vers des acides aminés. Cette activité de transpeptidation entraîne le transport d'acides aminés à travers la membrane vers la cellule (Orlowski et Meister 1970) (Figure 28). Le rôle des GGT dans le transport des acides aminés évoqué par Orlowski et Meister s'est révélé au cours des années très controversé de par les meilleures connaissances sur le cycle γ -glutamyl, les différentes enzymes impliquées et le transport des acides aminés et le glutathion ainsi que la découverte de nouvelles enzymes dégradant le glutathion (Bachhawat et Yadav 2018).

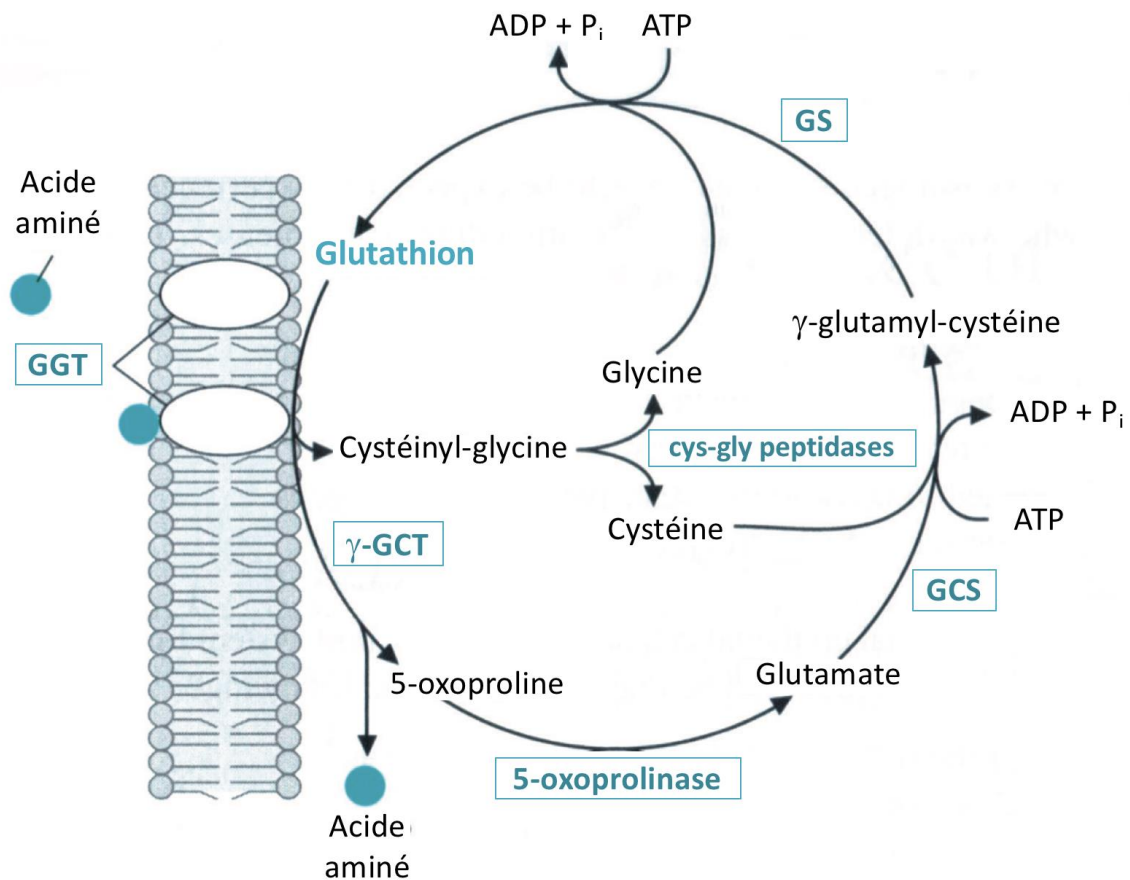


Figure 28 : Cycle γ -glutamyl.

À partir de glutamate et de cystéine, la GCS va produire la γ -glutamyl-cystéine. Cette dernière associée à de la glycine et sous l'action de la GS va produire le glutathion. Le glutathion est ensuite dégradé en 5-oxoproline et cystéinyl-glycine par les enzymes de la famille γ -GCT. Le glutathion peut également être dégradé par les GGT *via* un mécanisme de transpeptidation permettant l'entrée d'acides aminés dans la cellule. La cystéinyl-glycine produite par la dégradation du glutathion est clivée par des cys-gly peptidases en glycine et cystéine. La 5-oxoproline est clivée par la 5-oxoprolinase en glutamate. Les acides aminés alors libérés peuvent être réinvestis dans un nouveau cycle.

(D'après Abdul-Rasheed *et al.* 2010).

Les connaissances concernant la biosynthèse du glutathion au sein du cycle γ -glutamyl sont limitées dû à la complexité de la compartimentalisation des substrats du glutathion et leurs métabolismes au niveau cellulaire et de l'organe.

c) Fonctions et dérégulations du glutathion

Le glutathion a pour principale fonction le maintien de l'homéostasie redox. Le glutathion formé *via* le cycle γ -glutamyl est la forme réduite, GSH, qui peut être oxydée pour former le GSSG. Le glutathion est maintenu dans son état réduit par l'action de la glutathion réductase en utilisant un autre couple redox le NADPH/NADP⁺ de la voie du pentose phosphate. Les glutaredoxines aussi connues comme des transférases de thiol catalysent la glutathionylation réversible des protéines avec des groupements thiol. Elles vont utiliser deux molécules de GSH et générer une molécule de GSSG et permettre un échange thiol-disulfure des protéines. Ainsi le glutathion joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie redox (Liu *et al.* 2014) (Figure 29).

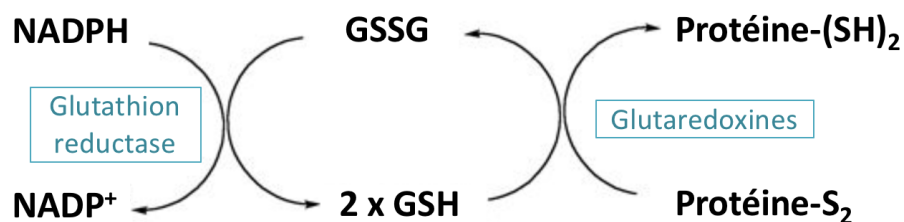


Figure 29 : Glutathion et homéostasie redox.

Le GSSG peut être réduit en GSH par la glutathion réductase en utilisant le couple redox NADPH/NADP⁺. Le GSH peut être oxydé en GSSG par des glutaredoxines lors d'une réaction catalysant un échange thiol-disulfure des protéines. (D'après Liu *et al.* 2014).

La biosynthèse de glutathion *via* le cycle γ -glutamyl permet le stockage de cystéine, le GSH permet ainsi aux cellules de disposer d'une source continue de cystéine, acide aminé non essentiel pour l'homme mais dont la présence est très importante dans les protéines puisqu'elle permet la formation de ponts disulfure. Le stockage de cystéine est une fonction importante du glutathion puisque la cystéine extracellulaire est extrêmement instable et est rapidement auto-oxydée en cystine *via* un processus qui produit des radicaux libres potentiellement toxiques (Lu 2009).

Le glutathion possède également d'autres fonctions. Il permet notamment la détoxification des xénobiotiques et de leurs métabolites ainsi que la neutralisation des ions superoxydes en oxydant le peroxyde d'hydrogène (Melo *et al.* 2017). Le glutathion est également un régulateur de la croissance et de la mort cellulaire. En effet, une augmentation de GSH est associée à une réponse proliférative précoce et est essentielle pour l'entrée des cellules en phase S de réplication de l'ADN du cycle cellulaire (Lu 2009). De plus, une déplétion de glutathion, entraînant un stress oxydant, est associée à la mise en place de l'apoptose (Franco et Cidlowski 2009). Une surexpression des enzymes biosynthétiques du glutathion et donc une augmentation des concentrations intracellulaires de glutathion ont été montrées comme protectrices contre l'apoptose induite par différents stimuli (Botta *et al.* 2004). La déplétion du glutathion et l'hyperoxydation ont été montrées comme des conséquences du stress du RE pouvant induire de l'apoptose (McCullough *et al.* 2001).

De nombreuses maladies aiguës et chroniques ont été associées avec un défaut de régulation de la biosynthèse du glutathion ainsi qu'avec une diminution d'expression de certaines enzymes du cycle γ -glutamyl (Tableau 2).

| Pathologie | Effet sur le glutathion | Enzyme potentiellement associée |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| Viellissement | ↘ GSH | GCS et GS |
| Diabète | ↘ GSH | GCS |
| Maladies neurodégénératives | ↘ GSH | 5-oxoprolinase et cys-gly peptidase |
| Cancer | ↗ GSH | GCS et GS |
| Maladies alcooliques du foie | ↘ GSH | GCS et GS |
| Cholestase | ↘ GSH | GCS et GS |
| Maladies cardiaques | ↘ GSH | GGT |
| Maladies pulmonaires | ↘ GSH | GS |
| Mucoviscidose | ↘ GSH | Inconnu |

Tableau 2 : Dérégulation de la biosynthèse du glutathion et pathologies.
Tableau décrivant des pathologies associées à une dérégulation du glutathion et les enzymes potentiellement impliquées dans cette dérégulation.
 (D'après Ballatori *et al.* 2009, Lu 2009).

Cependant les mécanismes moléculaires impliqués dans ces dérégulations en lien avec certaines pathologies restent inconnus comme c'est le cas dans la mucoviscidose.

2.4.2. CHAC1 dégrade le glutathion

En 2009, CHAC1, protéine pro-apoptotique, est identifiée comme appartenant à la voie UPR du stress du RE (Mungrue *et al.* 2009) mais sa fonction reste inconnue. C'est quelques années plus tard que Kumar et ses collaborateurs identifient la fonction de CHAC1 comme γ -GCT dégradant le glutathion (Kumar *et al.* 2012).

Les auteurs ont pu identifier la fonction de CHAC1 par des analyses de prédiction de structure de la protéine CHAC1 et de son homologue chez la levure YER163c grâce au logiciel PHYRE. Ils ont pu observer la présence d'un repliement BtrG/ γ -GCT caractéristique des protéines γ -GCT composé d'un unique feuillet β et entouré d'hélices α (Figure 30).

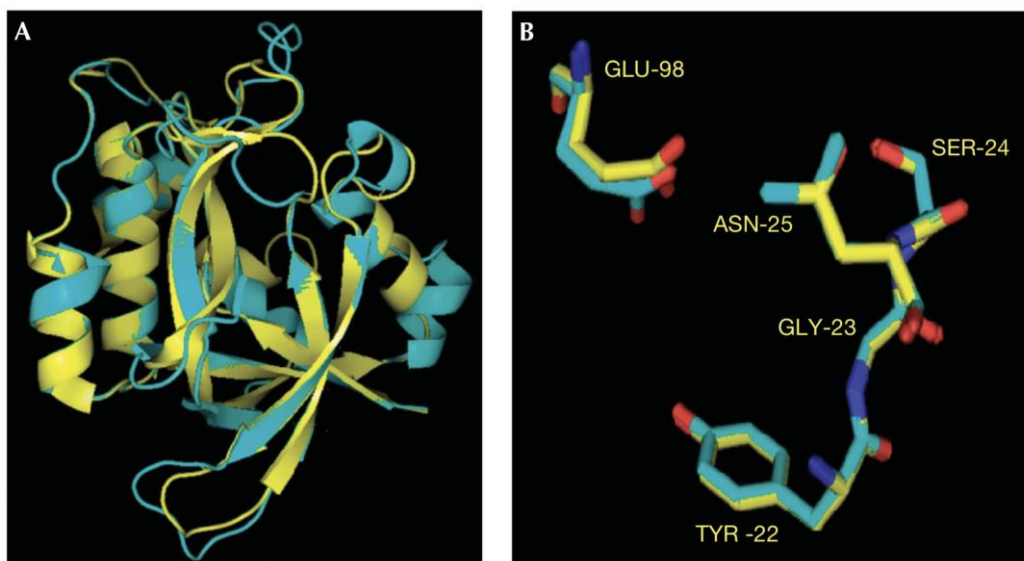


Figure 30 : Structure de la protéine CHAC1.

(A) Superposition de la structure de CHAC1 modélisée par homologie (bleu) sur la structure des protéines γ -GCT (jaune). (B) Résidus présumés du site actif de CHAC1 (E^{116} et $^{39}YGSL^{42}$ en bleu) superposés aux résidus du site actif des protéines γ -GCT (E^{98} et $^{22}YGSN^{25}$ en jaune).
(D'après Kumar *et al.* 2012).

Lorsque la structure de la protéine CHAC1 est superposée à celle des γ -GCT, les auteurs ont observé une forte similarité structurale bien qu'il n'y ait pas d'homologie de séquence entre

CHAC1 et les protéines γ -GCT. Ils ont également observé une similarité entre les résidus E¹¹⁶ et ³⁹YGSL⁴² de CHAC1 et les résidus E⁹⁸ et ²²YGSN²⁵ des protéines γ -GCT qui sont impliqués dans la fixation du substrat et la catalyse (Figure 30). L'alignement des séquences a été vérifié chez les homologues de CHAC1 dans différents phylums et a révélé que toutes les protéines CHAC contiennent un motif BtrG/ γ -GCT et un résidu glutamate catalytique qui sont la signature des protéines de la famille CHAC qui appartiennent à la famille des γ -GCT (Kumar *et al.* 2012).

Les auteurs se sont ensuite intéressés à l'activité de CHAC1 pour identifier les substrats de son activité γ -GCT. Pour cela ils ont cloné les gènes *ChaC1* chez la souris, *YER163c* chez la levure et *chaC1* chez *Escherichia coli* (*E. coli*) qu'ils ont exprimé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ils ont ensuite regardé la croissance des levures en présence de différents substrats. Ils ont observé que les protéines CHAC1 partagent avec les protéines γ -GCT, une activité cyclotransférase grâce aux résidus catalytiques E¹¹⁵ chez la levure et E¹¹⁶ chez la souris, malgré des différences de substrats. En effet, le substrat préféré des protéines CHAC1 est le glutathion, elles n'ont quasiment aucune activité envers les dipeptides γ -glutamyl. Les protéines CHAC1 vont dégrader le glutathion en 5-oxoproline et cystéinyl-glycine. Lorsque CHAC1 est surexprimé, il a été observé une déplétion de glutathion associée à une augmentation du nombre de cellules apoptotiques (Kumar *et al.* 2012). Cette étude a donc pu mettre en évidence l'identification d'un nouveau groupe de protéines γ -GCT, les protéines de la famille CHAC qui agissent spécifiquement sur le glutathion.

Différentes études ont ensuite confirmé la fonction de CHAC1 comme γ -GCT qui dégrade le glutathion et plus particulièrement sa forme réduite, le GSH (Tsunoda *et al.* 2014, Crawford *et al.* 2015). Étant donné le rôle du glutathion dans la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose, Crawford et ses collaborateurs ont proposé que l'induction de CHAC1 en conditions de stress du RE pourrait induire un signal bi-phasique : dans un premier temps l'arrêt du cycle cellulaire permettant à la cellule de s'adapter au stress puis dans un second temps l'apoptose si le stress est insurmontable (Crawford *et al.* 2015).

Deux études récentes ont identifié un autre membre de la famille des protéines CHAC. En 2016, Kaur et ses collaborateurs identifient CHAC2 qui possède environ 50 % d'homologie de séquence avec CHAC1 et une activité catalytique 10 à 20 fois plus faible. Ils ont observé que CHAC2, de la même manière que CHAC1, est capable de dégrader le glutathion réduit, même

si ce sont deux protéines distinctes au sein de la famille CHAC étant donné que CHAC2 est exprimé constitutivement dans les cellules à l'inverse de CHAC1 qui est finement régulé (Kaur *et al.* 2017). De façon contradictoire, l'étude de Wang un an plus tard, a montré qu'une diminution de CHAC2 entraînait une diminution du GSH. Selon leur étude, CHAC2 préviendrait la dégradation du glutathion médiée par CHAC1. CHAC2 serait en compétition avec CHAC1 pour maintenir l'homéostasie du glutathion (Wang *et al.* 2017).

2.4.3. Mucoviscidose et glutathion

Il est connu dans la littérature depuis de nombreuses années que les patients atteints de mucoviscidose ont des défenses anti-oxydantes insuffisantes pour faire face au stress oxydant élevé qu'ils subissent. Les lésions pulmonaires oxydatives récurrentes, contribuent au déclin de la fonction pulmonaire chez ces patients (Brown *et al.* 1996).

Le liquide de surface des voies aériennes contient de grandes quantités de GSH, environ 50 fois ce qui est retrouvé dans le plasma (Cantin *et al.* 1987). Il a de plus été montré que le canal CFTR est un transporteur de glutathion réduit ou oxydé (voir partie « Fonctions de CFTR » p31) (Linsdell et Hanrahan 1998). En revanche, les concentrations en GSH dans le liquide de surface des voies aériennes de patients atteints de mucoviscidose sont fortement réduites (Roum *et al.* 1993) ce qui pourrait exacerber le sévère stress oxydant résultant de l'inflammation chronique des poumons CF. L'infiltration de neutrophiles dans les poumons est une caractéristique de l'infection à *P. aeruginosa* et de l'inflammation résultante et c'est une source significative de stress oxydant. Les neutrophiles répondent aux stimuli inflammatoires en relarguant des ROS telles que les superoxydes et le peroxyde d'hydrogène (Suntres *et al.* 2002). Le GSH ainsi que l'ascorbate et l'urate présents dans le liquide de surface des voies aériennes représentent la première ligne de défense des poumons contre ces ROS et le stress oxydant. L'entretien du GSH dans le liquide de surface des voies aériennes est une réponse adaptative importante au cours d'une infection et de l'inflammation qui en découle. Il a été montré chez des souris sauvages, qu'une infection à *P. aeruginosa* entraîne une forte réponse inflammatoire au niveau des poumons des souris. De façon concomitante avec la réponse inflammatoire, une réponse adaptée caractérisée par une augmentation des niveaux d'antioxydants dans le liquide de surface des voies aériennes se met en place, avec une

augmentation d'un facteur trois des niveaux de GSH. Le GSH a alors pour rôle de minimiser les dommages liés au stress oxydant induit par l'infection à *P. aeruginosa*. Cette réponse adaptative est absente chez les souris *CFTR* déficientes (Day *et al.* 2004). Les poumons se défendent face au stress oxydant induit par des stimuli inflammatoires en augmentant les niveaux intracellulaires d'antioxydants, surtout en stimulant le transfert apical de molécules antioxydantes comme le glutathion qui nécessite une protéine CFTR fonctionnelle.

Plusieurs stratégies antioxydantes pour les patients CF ont été suggérées, notamment concernant le glutathion. En 1993, Roum et ses collaborateurs sont les premiers à proposer l'utilisation du glutathion en inhalation chez 7 patients CF (Roum *et al.* 1993). Ce traitement est bien toléré par les patients et produit une augmentation d'un facteur deux des niveaux de glutathion dans le liquide de surface des voies aériennes ainsi qu'une diminution de la production de superoxyde dans les lavages bronchoalvéolaires des patients CF. L'effet de cette thérapie par aérosol de GSH semble être spécifique des poumons étant donné qu'il n'y a pas de variation des concentrations plasmatiques en GSH et GSSG après la thérapie par le glutathion. Une seconde étude en 2004, a montré que l'utilisation du glutathion inhalé chez 17 patients CF entraînait une augmentation d'un facteur trois à quatre des niveaux de glutathion dans le liquide de surface des voies aériennes ainsi qu'une augmentation du VEMS (volume expiratoire maximal par seconde) qui est l'un des paramètres cliniques majeurs mesuré chez les patients CF. Cette étude n'a pas pu montrer de corrélation entre les niveaux de glutathion et de lipides oxydés (Griese *et al.* 2004). Ce n'est qu'en 2005 que la première étude double aveugle placebo-contrôle a été effectuée chez 19 patients CF (Bishop *et al.* 2005). Cette étude utilisant un dosage plus important de glutathion a montré que l'inhalation de glutathion est bien tolérée par les patients et entraîne une augmentation de nombreux indicateurs cliniques. Aucune étude clinique n'a abouti à la mise sur le marché de glutathion inhalé.

2.5. CHAC1 et pathologies

CHAC1 est une protéine étudiée depuis le début des années 2000. Elle a été associée à des pathologies ou des processus physiologies variés impliquant majoritairement ses fonctions

dans la voie UPR du stress du RE, l'apoptose et le métabolisme du glutathion (Mungrue *et al.* 2009, Kumar *et al.* 2012).

2.5.1. CHAC1 et cancer

Une quinzaine de publications ces dernières années ont étudié le rôle de CHAC1 dans différents cancers. La littérature n'est cependant pas unanime concernant le rôle de CHAC1 comme protéine pro ou anti-oncogénique.

En 2012, Goebel et ses collaborateurs se sont intéressés au rôle pronostic de l'expression de CHAC1 chez des patientes atteintes de cancer du sein et des ovaires (Goebel *et al.* 2012). En effet, la voie UPR du stress du RE étant activée dans différentes tumeurs cancéreuses incluant le cancer du sein (Scriven *et al.* 2009) et CHAC1 ayant été montré comme appartenant à la voie UPR du stress du RE (Mungrue *et al.* 2009), de nouveaux axes de recherche concernant CHAC1 et cancer ont été développés. Il a été montré que l'augmentation de l'expression de CHAC1 est associée à la sévérité du grade et la taille des tumeurs du cancer du sein ainsi qu'à un mauvais pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer des ovaires. Le rôle de CHAC1 dans la biologie tumorale du cancer du sein et des ovaires peut s'expliquer par un rôle de CHAC1 dans l'induction de la migration et de la prolifération cellulaire (Goebel *et al.* 2012). En 2012 également, une autre équipe a pu montrer une corrélation positive entre l'expression de CHAC1 et la taille des tumeurs dans une lignée de cellules de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Joo *et al.* 2012). Quelques années plus tard, Jahn et ses collaborateurs ont développé un nouveau score pronostic pour les patientes atteintes de cancer du sein combinant les prédicteurs pronostiques classiques de survie globale et l'information génétique sur l'expression en ARNm de *CHAC1* (Jahn *et al.* 2017). Ce score a pour but d'aider les décisions concernant le traitement par chimiothérapie chez les patientes souffrant d'un cancer du sein. En effet, la voie UPR pourrait être impliquée dans l'échec de la réponse à la chimiothérapie dans certains cancers (Scriven *et al.* 2007).

Le rôle de CHAC1 comme protéine pro-apoptotique (Mungrue *et al.* 2009) a également suscité un intérêt dans la compréhension de la tumorigénèse de différents cancers. Deux études ont montré une expression plus faible de CHAC1 dans des lignées cellulaires issues de neuroblastomes et de glioblastomes humains. Dans ces lignées CHAC1 serait inhibé par des

facteurs de transcription pro-oncogéniques de façon à ce que les cellules cancéreuses n'entrent pas en apoptose permettant leur survie et le développement des tumeurs (Qiu *et al.* 2017, Sun *et al.* 2017, Dali *et al.* 2018). CHAC1 a aussi été montré comme augmenté en réponse à une neurotoxine induisant la mort cellulaire dans une lignée de neuroblastomes humains (Do 2014).

D'autres études se sont intéressées à CHAC1 et son implication dans la réponse à des traitements anti-cancéreux tels que la chimiothérapie. Il a été montré dans le contexte de glioblastomes humains que le temozolomide, drogue chimiothérapeutique utilisée dans le traitement de gliomes malins, induit une augmentation de l'expression de CHAC1 *via* la voie Notch ce qui va induire la mort cellulaire des cellules du gliome par apoptose et autophagie (Chen *et al.* 2017). L'inhibition de la voie Notch par CHAC1 était déjà connue dans la neurogénèse corticale chez la souris (CHAC1 est appelé Botch dans ce contexte) (Chi *et al.* 2012). CHAC1 a également été montré comme induit en réponse au farnésol, isoprénoïde aux propriétés anti-tumorales et potentielle drogue thérapeutique dans le traitement de certains cancers, dans une lignée de lymphocytes T leucémiques induisant la mort par apoptose *via* la voie UPR du stress du RE de ces cellules (Joo *et al.* 2015). De la même manière, il a été montré un rôle clé de CHAC1 dans l'efficacité du terameprocol comme drogue anti-cancer dans des lignées de cellules de cancer de la prostate (Kimura et Huang 2016). Il a également été indiqué que la voie UPR du stress du RE et CHAC1 sont induits en réponse à différentes molécules aux propriétés anti-cancéreuses dans le contexte du cancer du sein (Galluzzi *et al.* 2012, Mazzio *et al.* 2017).

Enfin le rôle de CHAC1 dans le métabolisme du glutathion a également été exploité dans la recherche contre le cancer. Deux études ont montré que la privation en cystine des lignées cellulaires humaines de cancer du sein par modification du milieu de culture ou par inhibition chimique de l'antiport Xc⁻ (transporteur membranaire permettant l'entrée de cystine dans la cellule en échange de glutamate intracellulaire) entraîne une induction de la voie eIF2 α -ATF4-CHAC1 menant à la dégradation du glutathion intracellulaire, une augmentation du stress oxydant et la mort cellulaire par nécrose et ferroptose (Dixon *et al.* 2014, Chen *et al.* 2017).

Les trois fonctions connues de CHAC1 à savoir son rôle dans le stress du RE, l'apoptose et le métabolisme du glutathion ont été montrées comme impliquées dans les mécanismes de

tumorigénèse de différents cancers ainsi que dans différentes stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses (Tableau 3).

| | Références | Expression de CHAC1 | Stratégie thérapeutique |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| Cancer du sein | Goebel <i>et al.</i> 2012 | ↗ | - |
| | Galluzzi <i>et al.</i> 2012 | - | ↗ CHAC1 par le CTet |
| | Dixon <i>et al.</i> 2014 | - | ↗ CHAC1 par l'erastine |
| | Mazzio <i>et al.</i> 2017 | - | ↗ CHAC1 par l'acide boswellique |
| | Jahn <i>et al.</i> 2017 | ↗ | - |
| | Chen <i>et al.</i> 2017 | - | ↗ CHAC1 par la privation de cystine |
| Glioblastome | Chen <i>et al.</i> 2017 | - | ↗ CHAC1 par le TMZ |
| | Dali <i>et al.</i> 2018 | ↘ | - |
| Neuroblastome | Qiu <i>et al.</i> 2017, Sun <i>et al.</i> 2017 | ↘ | - |
| | Do 2014 | - | ↗ CHAC1 par le MPP ⁺ |
| Cancer de la prostate | Kimura et Huang 2016 | - | ↗ CHAC1 par le M ₄ N |
| Carcinome épidermoïde de la tête et du cou | Joo <i>et al.</i> 2012 | ↗ | - |
| Leucémie | Joo <i>et al.</i> 2015 | - | ↗ CHAC1 par le farnésol |

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différentes publications concernant CHAC1 et cancer.
 CTet : dérivé tétramérique cyclique d'indole-3-carbinol, agent chimioprotecteur ; Erastine : inhibiteur pharmacologique de Xc⁻ ; TMZ : temozolomide ; MPP⁺ : neurotoxine ; M₄N : terameprocol.

2.5.2. CHAC1 et infection

De façon très intéressante, l'expression de CHAC1 a été étudiée dans différents contextes infectieux, notamment dans le cadre d'infection à des virus.

L'expression de CHAC1 a été montrée comme diminuée en réponse à l'infection par le virus de la grippe aviaire dans les reins de poulet et à l'infection par le génotype C de l'hépatite A dans les foies de canard (Zhang *et al.* 2008, Tang *et al.* 2013). De façon opposée, l'expression

de CHAC1 est augmentée en réponse à l'infection par le virus de la maladie de Newcastle (pseudopeste aviaire) dans des cellules rénales immortalisées de *Pteropus vampyrus* (roussette de Malaisie) (Glennon *et al.* 2015).

D'autres études transcriptomiques dans différents contextes infectieux ont montré une augmentation de l'expression de CHAC1 (Tableau 4).

| Pathogènes | Modèles | Techniques | Références |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------------|
| <i>P. aeruginosa</i> | Cellules épithéliales primaires des voies respiratoires de souris | Microarray | Kassim <i>et al.</i> 2007 |
| <i>Mycoplasma hominis</i> | HeLa S3 | Microarray | Hopfe <i>et al.</i> 2013 |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | CNDT-2 LCC-18 | Microarray | Dlugosz <i>et al.</i> 2014 |
| Coronavirus humain (229E) | HuH7 | Microarray | Poppe <i>et al.</i> 2017 |
| Cytomégalovirus humain (Δ US17) | HFF | Microarray | Gurczynski <i>et al.</i> 2014 |
| Flavivirus transmis par les tiques | HEK 293T | RNAseq | Mlera <i>et al.</i> 2016 |
| Virus Zika (MR766) | hNPCs | RNAseq | Rolfe <i>et al.</i> 2016 |

Tableau 4 : CHAC1 et infection.

Tableau récapitulatif des données de la littérature concernant une augmentation de l'expression de CHAC1 en réponse à différents pathogènes (modèle d'étude, technique d'analyse).

HeLa S3 : lignée cellulaire de carcinome cervical humain ; CNDT-2/LCC-18 : lignées cellulaires entéro-endocrines humaines ; HuH7 : cellules d'hépatome humain ; HFF : fibroblastes humains ; HEK 293T : cellules rénales embryonnaires humaines ; hNPCs : cellules progénitrices neurales humaines.

Enfin, CHAC1 a été étudié dans le contexte d'une infection à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), une bactérie Gram négatif, flagellée, qui infecte la muqueuse gastrique (Wada *et al.* 2018). L'infection par *H. pylori* est connue pour induire une augmentation de la production de ROS et une diminution des niveaux intracellulaires de glutathion dans les cellules épithéliales gastriques. Les mécanismes de déplétion du glutathion par *H. pylori* ne sont pas connus. Au vu du rôle de CHAC1 dans le métabolisme du glutathion, les auteurs ont fait l'hypothèse que les variations de glutathion observées au cours de l'infection par *H. pylori* résultent de l'induction de CHAC1. Lorsque des cellules épithéliales gastriques humaines sont infectées par

H. pylori, il y a bien une augmentation de l'expression de CHAC1 et une déplétion de GSH ainsi qu'une accumulation de ROS résultantes de cette augmentation. Ils ont également montré que les changements de la balance redox suite à une surexpression de CHAC1 entraînent des mutations du gène suppresseur de tumeur TP53 (*tumor protein 53*) qui représentent une contribution possible au développement de carcinomes gastriques (Wada *et al.* 2018). Les mécanismes d'induction de CHAC1 par *H. pylori* ne sont pas connus.

2.5.3. Autres

CHAC1 a également été étudié dans d'autres contextes pathologiques (Figure 31). La plupart des études citant CHAC1 sont des analyses de transcriptomes dans des contextes sains ou pathologiques qui ont montré CHAC1 comme dérégulé. Ainsi CHAC1 est augmenté :

- chez le saumon d'Atlantique lors d'une expérience de réalimentation, protocole expérimental perturbant la croissance musculaire du saumon (Bower et Johnston 2010).
- dans des cellules acineuses pancréatiques de rat en réponse à un traitement prolongé par la gastrine (hormone normalement sécrétée uniquement après un repas pour stimuler la sécrétion d'acides gastriques) (Selvik *et al.* 2013).
- chez des souris ayant subi une lésion axonale par écrasement du nerf optique (Yasuda *et al.* 2014).
- dans les rates de souris exposées aux nanoparticules de dioxyde de titane, molécules toxiques induisant des phénomènes de stress du RE, d'apoptose et d'inflammation (Sheng *et al.* 2014).
- dans les lentilles optiques de souris mutées pour une protéine clé dans l'établissement de l'architecture des cellules à fibre optique (modèle de cataracte) (Zhou *et al.* 2016).
- dans les cœurs de souris invalidés génétiquement pour les récepteurs à l'adénosine 2A impliqués dans la pathogenèse des lésions myocardiques (Ashton *et al.* 2017).
- dans le plumage dorsal noir de poulets Muchuan aux os noirs par rapport au plumage blanc indiquant un rôle de CHAC1 dans la mélanogenèse (Yu *et al.* 2018).

Le rôle de CHAC1 dans la voie du stress du RE et plus précisément en aval de ATF4 a été étudié dans différents contextes pathologiques. Tout d'abord dans le cadre de maladies alcooliques du foie, il a été montré que CHAC1 et la voie ATF4 sont augmentés en réponse à l'éthanol et au cytochrome P450 2E1 (molécule induite par l'éthanol dans le foie) dans une lignée d'hépatocytes humains (Magne *et al.* 2011). De plus, dans le contexte d'un empoisonnement par l'arsenic, il a été montré que TRIB3 (*tribbles homolog 3*, molécule induite par ATF4) augmente la résistance de fibroblastes embryonnaires de souris à l'arsenic en limitant l'expression de CHAC1 (Ord *et al.* 2016).

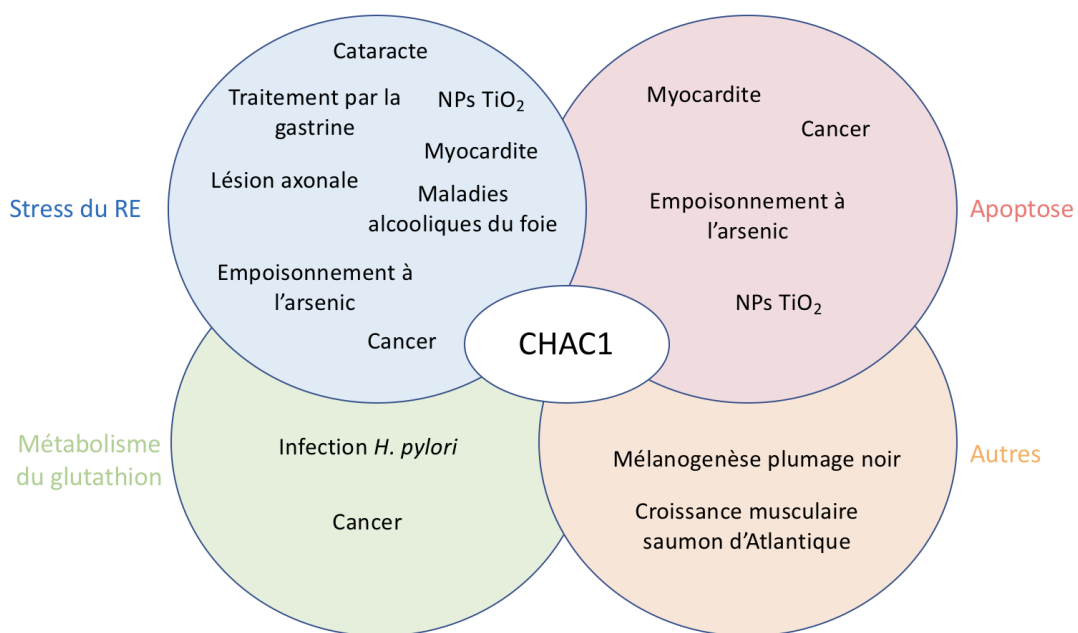


Figure 31 : CHAC1 : fonctions et pathologies.
Schéma récapitulatif des différentes fonctions de CHAC1 en relations avec différentes pathologies.
NPs TiO₂ : nanoparticules de dioxyde de titanium.

Depuis ces 20 dernières années, CHAC1 a donc été décrit dans différents contextes pathologiques généralement peu élucidés, impliquant le plus souvent ses rôles dans le stress du RE, le métabolisme du glutathion ou encore l'apoptose (Figure 31).

Objectifs

L'atteinte pulmonaire représente la première cause de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose. Les mutations de *CFTR* entraînent la mise en place d'un terrain favorable à la colonisation bactérienne au niveau des voies aériennes des patients CF ainsi que la mise en place de cycles chroniques d'infection et d'inflammation aboutissant à la dégradation de l'épithélium pulmonaire et à terme au déclin de la fonction respiratoire chez les patients CF. *P. aeruginosa* est l'un des pathogènes majoritaire retrouvé chez les patients CF tout au long de leur vie sans éradication complète. L'épithélium pulmonaire joue un rôle essentiel dans la lutte contre les infections. Ainsi dans la mucoviscidose, l'installation d'une infection chronique pulmonaire à *P. aeruginosa* pourrait être liée à une altération de la réponse des cellules épithéliales ne permettant pas la mise en place d'une défense adéquate. Il a été montré que cette réponse des cellules épithéliales à *P. aeruginosa* est effectivement différente par une analyse comparative des transcriptomes de cellules épithéliales bronchiques primaires issues de donneurs sains et de patients atteints de mucoviscidose infectées par *P. aeruginosa* (Balloy *et al.* 2015). Le but de cette étude était de déterminer les gènes différentiellement exprimés en réponse à l'infection par *P. aeruginosa* dans les cellules primaires CF par rapport aux cellules non-CF ce qui pourrait expliquer la réponse inflammatoire et l'infection chronique à *P. aeruginosa* présente chez les patients atteints de mucoviscidose. Cette étude a permis d'identifier *CHAC1*. *CHAC1* est une protéine pro-apoptotique induite par la voie PERK du stress du réticulum endoplasmique, capable de dégrader la forme réduite du glutathion, dont l'implication dans la mucoviscidose ou dans d'autres pathologies pulmonaires n'a jamais été suggérée.

L'objectif de ce travail était d'étudier le rôle de *CHAC1* dans la réponse des cellules épithéliales bronchiques infectées par *P. aeruginosa* dans le contexte de la mucoviscidose.

Nous nous sommes donc, dans un premier temps, intéressés au rôle de *CHAC1* dans la réponse inflammatoire en réponse à des facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (flagelline et LPS) par une stratégie de siRNA. Puis nous avons cherché à déterminer par quelle voie de signalisation *CHAC1* est induit en réponse au LPS de *P. aeruginosa* en nous appuyant sur les données de la littérature. Enfin nous nous sommes intéressés au rôle de *CHAC1* dans la mise en place de l'apoptose en réponse à l'infection par *P. aeruginosa*.

Les résultats de cette étude permettent une meilleure compréhension du rôle de *CHAC1* dans le contexte infectieux et inflammatoire de la mucoviscidose.

Résultats

1. Résumé de l'article

Cet article a été soumis au journal « *Cellular and Molecular Immunology* ».

1.1. Contexte de l'étude

La mucoviscidose est la maladie génétique rare à transmission autosomique récessive la plus fréquente dans les populations d'origine caucasienne. La mucoviscidose affecte de nombreux organes mais l'atteinte pulmonaire prédomine et est la principale cause de morbidité et mortalité des patients CF. La déficience de CFTR entraîne une altération de la clairance mucociliaire et un défaut des défenses immunitaires innées des patients se traduisant par une inflammation et des infections chroniques entraînant la dégradation de l'épithélium pulmonaire et des lésions pulmonaires progressives. *P. aeruginosa* est le pathogène majoritaire chez les patients CF adultes. La colonisation à *P. aeruginosa* entraîne une forte réponse inflammatoire chez les patients CF. Dans la mucoviscidose, l'établissement d'une infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* est liée à une altération de la réponse des cellules épithéliales qui ne permet pas la mise en place de défenses adéquates. Dans une étude précédente, le laboratoire a montré que cette réponse était effectivement différente par une analyse comparative des transcriptomes de cellules primaires épithéliales bronchiques (hAECBs) issues de patients CF et de donneurs sains non-CF au cours de l'infection à *P. aeruginosa* (Balloy *et al.* 2015). Cette étude a permis d'identifier *CHAC1* (*Chac* glutathione-specific γ -glutamylcyclotransferase 1) comme l'un des gènes les plus différenciellement exprimés entre les cellules non-CF et CF.

CHAC1 est une protéine identifiée en 2009 chez les mammifères comme un nouveau composant de la voie UPR du stress du réticulum endoplasmique (RE) en aval de la voie PERK-ATF4-CHOP. CHAC1 a également été décrit comme nécessaire et suffisant pour induire des marqueurs de l'apoptose (Mungrue *et al.* 2009). De plus CHAC1 est une enzyme capable de dégrader le glutathion (Kumar *et al.* 2012). De nombreuses études ont montré un lien entre stress du RE et inflammation. Le rôle de CHAC1 dans cette interaction entre stress du RE et inflammation dans le contexte de l'infection à *P. aeruginosa* n'a jamais été étudié. Ici, nous émettons l'hypothèse que CHAC1 pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'inflammation induite par *P. aeruginosa* mais aussi dans l'apoptose.

1.2. Résultats

Dans cette étude, nous avons tout d'abord montré qu'il y a une régulation défectueuse de CHAC1 dans les cellules CF. Les résultats du transcriptome ont montré que l'expression en ARNm de *CHAC1* est plus importante dans les hAECBs non-CF par rapport aux CF à l'état basal et est induite uniquement dans les hAECBs non-CF après 6 heures d'infection par *P. aeruginosa* (Figure 1A). CHAC1 ayant été décrit comme appartenant à la voie UPR du stress du RE, nous avons également extrait les données transcriptomiques concernant certains gènes précédemment décrits dans la réponse au stress du RE associée à CHAC1 qui sont consistantes avec les variations d'expression de CHAC1 (Figure supplémentaire 1). Nous avons également validé cette expression différentielle de *CHAC1* par qPCR dans les mêmes échantillons utilisés pour l'analyse transcriptomique. *CHAC1* est plus exprimé dans les cellules non-CF que CF et surexprimé uniquement dans les cellules non-CF après 6 heures d'infection à *P. aeruginosa* (Figure 1B).

Nous nous sommes ensuite intéressés à savoir quels étaient les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* impliqués dans l'induction de l'expression de CHAC1 dans les cellules non-CF. Nous avons montré que deux facteurs de virulence, le LPS et la flagelline de *P. aeruginosa* sont capables d'induire l'expression de CHAC1 dans des hAECBs primaires non-CF et dans la lignée de cellules épithéliales bronchiques NCI-H292 (Figures 1C et 2A). Nous avons également validé le rôle de la flagelline en utilisant une souche mutée de la souche PAK de *P. aeruginosa*, Δ FliC, déléetée pour la flagelline (Figure 2B). De plus, nous avons montré que l'induction de CHAC1 par *P. aeruginosa* n'est pas restreinte à la souche de laboratoire PAK, des souches cliniques fraîchement isolées de différents patients CF sont également capables d'induire, à des niveaux comparables, une augmentation de l'expression de CHAC1 (Figure 2C). Nous avons également testé deux autres pathogènes connus pour coloniser les voies aériennes des patients CF, *S. aureus* et *S. maltophilia*. En utilisant les mêmes MOI (*multiplicity of infection*), *S. aureus* et *S. maltophilia* induisent une réponse moins importante que *P. aeruginosa*, une augmentation plus faible de CHAC1 et une induction moindre d'IL-8 (Figure 2D).

Concernant l'expression protéique de CHAC1, nous avons montré en accord avec la littérature que CHAC1 est instable et nous n'avons pas été capable de détecter CHAC1 endogène au niveau protéique dans les cellules NCI-H292 en conditions basales (Figure supplémentaire 2B

et 2C et Figure 2E) mais uniquement en conditions de surexpression (Figure 2E) ou en présence d'un inhibiteur du protéasome, le MG-132 (Figure 2F).

Étant donné le rôle de CHAC1 dans la voie PERK du stress du RE, nous avons ensuite montré que l'augmentation de l'expression de CHAC1 par le LPS de *P. aeruginosa* est indépendante de PERK mais dépendante de ATF4 dans les cellules NCI-H292 (Figure 3).

Nous nous sommes également intéressés au rôle de CHAC1 dans la mise en place de l'apoptose. Nous avons observé dans les cellules NCI-H292 que *P. aeruginosa* n'induit pas le clivage de PARP et de la caspase-3, deux marqueurs de l'apoptose (Figure 4A). Néanmoins la surexpression de CHAC1 à l'aide d'un plasmide induit le clivage de PARP (Figure 4B).

Enfin nous nous sommes intéressés au rôle de CHAC1 dans la réponse inflammatoire induite par une stimulation par du LPS et de la flagelline de *P. aeruginosa* dans les cellules NCI-H292. Nous avons pu montrer une augmentation de différents paramètres inflammatoires (expression et sécrétion d'IL-8 et d'IL-6, sécrétion de PGE2 et expression de CCL2) en réponse à une stimulation par le LPS et la flagelline. De plus, en conditions d'inhibition de *CHAC1* par une stratégie de siRNA, nous avons observé une augmentation encore plus importante de l'expression et la sécrétion d'IL-8, de l'expression de CCL2 et de la sécrétion de PGE2 en réponse à la stimulation par le LPS et la flagelline. Et de façon opposée, nous avons observé une inhibition de la sécrétion et de l'expression de l'IL-6 en présence du siRNA de *CHAC1* en réponse à la stimulation par le LPS et la flagelline (Figure 5 et Figure supplémentaire 4). Nous avons également montré, dans les cellules NCI-H292 et dans une lignée de cellules alvéolaires, les A549 exprimant de façon stable le gène *NF-κB*-luciférase, que cette régulation des paramètres inflammatoires en réponse au LPS et à la flagelline implique le facteur de transcription NF-κB (Figure 6).

1.3. Conclusion

En conclusion, cette étude a permis d'identifier le transcrite *CHAC1* comme l'un des plus différentiellement exprimés entre les cellules épithéliales bronchiques de patients CF et de donneurs sains infectés par *P. aeruginosa*. *CHAC1* est plus exprimé dans les cellules non-CF que CF et est induit en réponse à l'infection par *P. aeruginosa* uniquement dans les cellules

non-CF. L'expression protéique de CHAC1 n'a pas pu être validée dans ce modèle en raison d'une forte instabilité et une dégradation rapide de la protéine CHAC1.

De plus, nous avons pu montrer une induction de CHAC1 par le LPS de *P. aeruginosa* indépendante du facteur PERK mais dépendante du facteur ATF4. Cette étude a également montré que CHAC1 n'est pas impliqué dans l'apoptose induite par *P. aeruginosa* mais est impliqué dans la régulation de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques induite par le LPS et la flagelline de *P. aeruginosa* via la voie de signalisation NF- κ B.

Cette étude montre une régulation déficiente de CHAC1 dans les cellules CF et un rôle de CHAC1 dans la modulation des paramètres inflammatoires en réponse à deux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*. Ceci suggère que CHAC1 pourrait contribuer à la réponse inflammatoire excessive des cellules épithéliales bronchiques envers l'infection chronique à *P. aeruginosa* observée chez les patients atteints de mucoviscidose.

2. Article

The role of ChaC glutathione-specific γ -glutamylcyclotransferase 1 in the inflammatory response induced by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis

Perra Léa¹, Balloy Viviane¹, Foussignière Tobias¹, Moissenet Didier², Petat Hortense¹, Mungrue Imran N.³, Touqui Lhousseine⁴, Corvol Harriet^{1,5}, Chignard Michel¹, Guillot Loic^{1*}

¹Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris 75012, France

²Department of Bacteriology, APHP, Hôpital St-Antoine, Paris 75012, France

³Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, LA 70112, USA

⁴Equipe mixte Institut Pasteur/Paris V « Mucoviscidose et bronchopathies chroniques » Institut Pasteur, Paris 75015, France

⁵Pneumologie Pédiatrique, APHP, Hôpital Trousseau, Paris 75012, France

Keywords: cystic fibrosis, bronchial epithelium, *Pseudomonas aeruginosa*, inflammation
ChaC glutathione-specific γ -glutamylcyclotransferase 1, endoplasmic reticulum stress

***Corresponding author:** L. Guillot, Inserm UMR_S 938, CRSA, Inserm, Bât. Kourilsky, 34 Rue Crozatier, 75012 Paris, France

Tel.: +33 149 284 682

E-mail: loic.guillot@inserm.fr

Running title: CHAC1 regulates inflammation in cystic fibrosis

Funding: MC received a grant from the French cystic fibrosis nonprofit organizations, Vaincre La Mucoviscidose and Gregory Lemarchal. LP received a PhD fellowship from the French cystic fibrosis nonprofit organization, Vaincre La Mucoviscidose.

Abstract

In cystic fibrosis (CF), *Pseudomonas aeruginosa* colonizes the lungs, leading to chronic inflammation of the bronchial epithelium. ChaC glutathione-specific γ -glutamylcyclotransferase 1 (*CHAC1*) mRNA is differentially expressed in primary human airway epithelial cells from bronchi (hAECBs) from patients with CF and healthy patients at baseline and upon infection with *P. aeruginosa*. CHAC1 degrades glutathione and is associated with endoplasmic reticulum (ER) stress and apoptosis pathways. In this study, we examined the roles of CHAC1 in the inflammatory response and apoptosis in lung epithelial cells. First, we confirmed by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction that *CHAC1* mRNA was overexpressed in hAECBs from patients without CF compared with the expression in hAECBs from patients with CF upon *P. aeruginosa* (PAK strain) infection. Moreover, the *P. aeruginosa* virulence factors lipopolysaccharide (LPS) and flagellin (F) were shown to induce CHAC1 expression in cells from patients without CF. Using NCI-H292 lung epithelial cells, we found that LPS-induced *CHAC1* mRNA expression was PERK-independent and involved ATF4. Additionally, using CHAC1 small interfering RNA, we showed that reduced CHAC1 expression in the context of LPS and F stimulation was associated with modulation of inflammatory markers and alteration of NF- κ B signaling. Finally, we showed that *P. aeruginosa* was not able to induce apoptosis in NCI-H292 cells. Our results suggest that CHAC1 is involved in the regulation of inflammation in bronchial cells during *P. aeruginosa* infection and may explain the excessive inflammation present in the respiratory tracts of patients with CF.

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF), the most common severe autosomal recessive genetic disease in the Caucasian population, is caused by mutations in the CF transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene, which encodes a chloride channel¹⁻³. CF affects multiple organs; however, lung injury is predominant and is the leading cause of morbidity and mortality in patients with CF. In airways, *CFTR* dysfunction leads to excessive secretion of abnormally thick and viscous mucus and therefore to alterations in mucociliary clearance and impairment of innate immune host defenses. This results in chronic bacterial infection and inflammation, leading to degradation of the lung epithelium and progressive lung damage in patients with CF⁴. *Pseudomonas aeruginosa* is the leading cause of chronic pulmonary infection and a major pathogen in the airways of adults with CF^{5,6}. *P. aeruginosa* colonization induces a strong inflammatory response in patients with CF, particularly neutrophil accumulation and hypersecretion of inflammatory cytokines, such as interleukin-8 (IL-8)^{7,8}.

The lung epithelium plays an essential role in the fight against infections by orchestrating the innate immunity⁹. Lung epithelial cell activation has been shown to be sufficient to generate an innate protective immune response in mice infected with *P. aeruginosa*¹⁰. In CF, establishment of chronic pulmonary infection with *P. aeruginosa* is linked to alterations in epithelial cell responses, which do not allow establishment of an adequate defense system⁴. In a previous study, we showed that this response was indeed different by comparative analysis of the transcriptomic signatures of primary CF and non-CF bronchial epithelial cells during *P. aeruginosa* infection¹¹. We identified several up- and downregulated mRNAs in CF cells compared with those in non-CF cells, suggesting that these genes may be involved in the exacerbated inflammatory response to *P. aeruginosa* found in patients with CF. Among these dysregulated mRNAs, ChaC glutathione-specific γ -glutamylcyclotransferase 1 (CHAC1)

showed dramatically differential expression between non-CF and CF cells both at baseline and after *P. aeruginosa* infection.

CHAC1 was identified in mammalian cells for the first time in 2009 as a new component of the unfolded protein response (UPR) pathway¹². This UPR pathway is induced in response to endoplasmic reticulum (ER) stress due to the presence of misfolded proteins in the ER lumen. The UPR consists of three pathways initiated by inositol-requiring enzyme 1 α , eukaryotic translation initiation factor 2- α kinase 3 (PERK), and activation transcription factor (ATF) 6¹³. These three pathways alleviate ER stress by decreasing protein synthesis, facilitating protein folding, and increasing protein degradation. CHAC1 is induced by the PERK pathway downstream of ATF4 and the pro-apoptotic factor DNA damage-inducible transcript 3 (also called CHOP) and has been described as necessary and sufficient to induce markers of apoptosis, particularly the cleavage of the apoptotic factor poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP)¹². Moreover, CHAC1 can degrade glutathione in the cytosol of mammalian cells through its γ -glutamylcyclotransferase activity¹⁴. Various studies have shown a link between ER stress and inflammation^{13, 15, 16}. In the context of CF, atypical activation of the UPR pathway has been observed; the resulting ER stress can potentiate the inflammatory response¹³. Moreover, the UPR is implicated in the regulation of cytokine production for bacterial infections¹⁷. The role of CHAC1 in this interplay between ER stress and inflammation in the context of *P. aeruginosa* infection has never been investigated.

Accordingly, in this study, we hypothesized that CHAC1 may play a role in regulating the inflammatory process induced by *P. aeruginosa* infection and apoptosis.

RESULTS

Defective regulation of CHAC1 in CF cells

In a previous transcriptomic analysis, we identified CHAC1 as one of the differentially expressed mRNAs between human airway epithelial cells from bronchi (hAECBs) of patients with and without CF during *P. aeruginosa* infection ¹¹. Indeed, *CHAC1* mRNA was only induced in hAECBs from patients without CF (Figure 1A, log-2 Fold Change (FC) [0 versus 6 h] = 1.69, $p = 2.57 \times 10^{-4}$) with a differential expression log-2FC (CF versus non-CF) of -4.49 after 6 h of infection by *P. aeruginosa* (Figure 1A, Supplementary Table 1). Because CHAC1 belongs to the UPR pathway of ER stress initiated by PERK ¹², we analyzed the expression of genes shown to be involved in CHAC1-associated ER stress responses in our previous study. We observed that *ATF4*, *PCK2*, and *HERPUD1* were significantly downregulated in hAECBs from patients with CF versus in hAECBs from patients without CF (Supplementary Figure 1A-C and Supplementary Table 1). In contrast, *ATF3* and *TNFRSF6B* were upregulated (Supplementary Figure 1D, 1E and Supplementary Table 1) in hAECBs from patients with CF during the course of infection by *P. aeruginosa*. These results indicated an altered expression of mRNAs involved in the CHAC1-associated ER stress response (Supplementary Figure 1F) in CF cells.

We further validated the differential expression of *CHAC1* by qPCR in the same samples used for RNA-seq. Indeed, at baseline, we observed significantly higher expression of *CHAC1* in non-CF cells compared with that in CF cells. As expected from the transcriptomic data, we observed upregulation of *CHAC1* mRNA expression after 6 h of *P. aeruginosa* infection only in non-CF cells (5.3-fold increase, $p < 0.05$; Figure 1B).

Lipopolysaccharide (LPS) and flagellin (F) induced CHAC1 overexpression in primary bronchial epithelial cells and NCI-H292 cells

Because *P. aeruginosa* induced CHAC1 expression in non-CF cells, we investigated which *P. aeruginosa* virulence factors were involved. We studied the effects of two very well-known virulence factors, LPS and F from *P. aeruginosa*, on hAECBs from patients with and without CF and on NCI-H292 cells, which expressed *CHAC1* mRNA at sufficient levels for further knockdown experiments (inhibition by siRNA), in comparison to BEAS-2B cells (Supplementary Figure 2A). Notably, 6 h of stimulation with LPS and F induced a 2-fold increase in CHAC1 expression in hAECBs from patients without CF, similar to whole bacteria at an MOI of 0.25 for 6 h. This induction by LPS and F and by living bacteria was not found in hAECBs from patients with CF (Figure 1C). We observed similar effects of LPS and F on CHAC1 expression in NCI-H292 cells. F alone induced a 1.5-fold increase in CHAC1 expression, and LPS alone or combined with F induced a 2.5-fold increase in CHAC1 expression (Figure 2A). To validate the role of F in CHAC1 expression, we used a mutant of the *P. aeruginosa* PAK strain, Δ FliC, in which F was deleted. We observed a significantly lower increase in *CHAC1* mRNA expression when NCI-H292 cells were stimulated with the Δ FliC strain than with the wild PAK strain (Figure 2B). We also tested a double mutant of the *P. aeruginosa* PAK strain with both type II and III secretion systems deleted (Δ pscF Δ xcpQ). This mutant induced *CHAC1* mRNA expression, similar to the wild PAK strain (Figure 2B). The difference in CHAC1 expression observed with the Δ FliC strain was not due to different concentrations of bacteria since equal numbers of *P. aeruginosa* colonies were found after plating on LB agar (Supplementary Figure 3A). Subsequently, in order to determine whether the observed CHAC1 upregulation was restricted to the laboratory PAK strain, we used *P. aeruginosa* strains freshly isolated from different patients with CF (N = 4). We observed that clinical isolates of *P. aeruginosa* were also able to induce *CHAC1* mRNA expression in

NCI-H292 cells (Figure 2C) with an effect similar to the PAK laboratory strain. We also observed that the induction of *CHAC1* mRNA expression by PAK was higher in NCI-H292 cells than in primary cells (Figure 2B, 2C versus Figure 1C). Finally, we tested two other bacterial species known to colonize the airways of patients with CF, i.e., *Staphylococcus aureus* and *Stenotrophomonas maltophilia*. Using a similar MOI, we observed reduced *CHAC1* mRNA induction in NCI-H292 cells infected with *S. aureus* and *S. maltophilia* compared with that in the cells infected with the PAK strain. Concomitantly, induction of *IL-8* mRNA expression was reduced (Figure 2D). The differences in *CHAC1* and *IL-8* mRNA expression observed with *Staphylococcus aureus* and *Stenotrophomonas maltophilia* were not caused by varying concentrations of bacteria because equal numbers of colonies were found after plating on LB agar (Supplementary Figure 3C).

Next, we examined CHAC1 protein expression in response to *P. aeruginosa* stimulation. Consistent with previous reports indicating that CHAC1 protein is very unstable due to its rapid degradation by the proteasome in Neuro2a cells¹⁸, we were unable to detect endogenous CHAC1 protein in NCI-H292 at baseline (Supplementary Figure 2B) or after *P. aeruginosa* infection (data not shown). Additionally, we were unable to detect CHAC1 protein expression after treating the cells with tunicamycin, a known inducer of CHAC1 mRNA expression¹⁹ (data not shown). CHAC1 was only detected at the protein level when it was either overexpressed with a plasmid in NCI-H292 cells (Figure 2E) or when the cells were treated with at least 1 μ M of the proteasome inhibitor MG-132 (Figure 2F).

CHAC1 upregulation was ATF4 dependent and PERK independent

Because CHAC1 has been shown to be associated with the PERK pathway¹², we hypothesized that induction of CHAC1 by LPS from *P. aeruginosa* may be mediated by PERK. Therefore, we used the PERK inhibitor and tunicamycin (TM) as a positive control for activation of the

CHAC1 and PERK pathway¹². As expected, compared with untreated NCI-H292 cells, LPS and TM induced 2.4- and 17.7-fold increases, respectively, in *CHAC1* mRNA expression. When cells were treated with TM and PERK inhibitor, there was a significant 90.3% decrease in *CHAC1* mRNA expression compared with that in cells treated with TM alone (Figure 3A). However, when cells were treated with LPS and PERK inhibitor, *CHAC1* mRNA expression was not significantly different from that in cells treated with LPS only (Figure 3A). We then hypothesized that this induction of CHAC1 by LPS would directly pass through ATF4. Indeed, we observed that LPS was able to activate ATF4 and that siRNA against ATF4 inhibited this induction (Figure 3B). Concomitantly, we observed inhibition of CHAC1 induction by LPS with siRNA ATF4 (Figure 3C).

CHAC1 overexpression induced by *P. aeruginosa* did not stimulate apoptosis

CHAC1 has been shown to play a role in apoptosis¹²; therefore, we investigated the effects of *P. aeruginosa* stimulation on apoptosis. We infected NCI-H292 cells with two different MOIs (0.5 and 1) for 5 or 8 h and examined the levels of cleaved PARP and cleaved caspase-3. As expected, we observed that the positive control staurosporine induced cleavage of PARP and caspase-3. In contrast, *P. aeruginosa* did not induce cleavage of PARP and caspase-3 (Figure 4A). PARP and caspase-3 cleavages were observed when CHAC1 was overexpressed with a plasmid in NCI-H292 cells (Figure 4B).

CHAC1 regulated the inflammatory response of bronchial epithelial cells induced by LPS or F

CHAC1 is a component of the ER stress pathway, and a link between ER stress and the inflammatory response has already been described in the context of CF¹³. Therefore, we

investigated the role of CHAC1 in the inflammatory response induced by LPS or F. For this, we used siRNA targeting CHAC1 in NCI-H292 cells. We first checked the efficiency of the CHAC1 siRNA by measurement of *CHAC1* mRNA levels. Transfection with CHAC1 siRNA induced a 53% reduction in *CHAC1* mRNA expression (Figure 5A). We then examined different inflammatory parameters, particularly the secretion of IL-8, IL-6, and prostaglandin E2 (PGE₂), when CHAC1 was knocked down by siRNA and after stimulation with LPS and F from *P. aeruginosa*. As expected, we observed that 1 μg/mL LPS, 50 ng/mL F, and the combination of both (LPS+F) induced significant increases in both IL-8 ($\Delta_{\text{IL-8}}$: 5,369.19 pg/mL; $\Delta_{\text{IL-8}}$: 2,629.15 pg/mL; $\Delta_{\text{IL-8}}$: 5,560.22 pg/mL, respectively, compared with unstimulated cells) and IL-6 secretion ($\Delta_{\text{IL-6}}$: 1,828.94 pg/mL; $\Delta_{\text{IL-6}}$: 373.62 pg/mL; $\Delta_{\text{IL-6}}$: 2,149.61 pg/mL, respectively, compared with unstimulated cells) and tended to increase PGE₂ secretion (Figure 5B–D). Under these stimulation conditions, *CHAC1* mRNA expression was decreased using siRNA, and even greater significant increases in IL-8 secretion ($\Delta_{\text{IL-8}}$: 1,479.27 pg/mL; $\Delta_{\text{IL-8}}$: 2,774.37 pg/mL; with LPS alone or combined with F, respectively, compared with cells transfected with siRNA control under the same conditions of stimulation; Figure 5B) and PGE₂ secretion (Δ_{PGE_2} : 1,254.02 pg/mL; Δ_{PGE_2} : 1,220.65 pg/mL; Δ_{PGE_2} : 2,595.12 pg/mL; with LPS and F alone or with the combination of both, respectively, compared with cells transfected with siRNA control under the same conditions of stimulation; Figure 5D) were observed. In contrast, in the presence of CHAC1 siRNA, we observed significant inhibition of IL-6 secretion (Figure 5C) in cells stimulated with LPS (80% inhibition), F (30% inhibition), or the combination of both virulence factors (80% inhibition). We obtained similar results for the mRNA expression of *IL-8* and *IL-6* (Supplementary Figures 4A and 4C). *CCL2* mRNA expression was also modulated similar to *IL-8* expression under these experimental conditions (not detectable by enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA]; Supplementary Figure 4B).

CHAC1 regulated nuclear factor (NF)- κ B activation

To determine whether regulation of these inflammatory parameters involved the NF- κ B transcription factor, we studied its phosphorylation by western blot analysis in NCI-H292 cells. We observed that LPS induced a significant increase in NF- κ B p65 phosphorylation in CHAC1-knockdown cells after 1 h of stimulation (Figure 6A). To confirm these data, we also used a human alveolar cell line, A549 cells, stably transfected with an NF- κ B-luciferase plasmid. As in NCI-H292 cells, 60% inhibition of *CHAC1* mRNA expression was observed after siRNA transfection (data not shown). Similar to NCI-H292 cells, we observed that 1 μ g/mL LPS, 50 ng/mL F, and the combination of both (LPS+F) induced a significant increase in IL-8 secretion when A549 cells were transfected with CHAC1 siRNA compared with that in cells transfected with siRNA control (Figure 6B). Additionally, as expected, we observed that 1 μ g/mL LPS, 50 ng/mL F, and the combination of both (LPS+F) induced significant increases in NF- κ B activity (1.3-, 1.7-, and 1.7-fold increases, respectively, compared with unstimulated cells; Figure 6C). Under these experimental conditions, when we decreased *CHAC1* mRNA expression, we observed an even greater increase in NF- κ B activity when cells were stimulated with LPS (1.4-fold increase) and/or F (1.5- and 1.4-fold increases compared with cells transfected with siRNA control under the same conditions of stimulation; Figure 6C). IL-6 and CCL-2 were not detectable by ELISA (data not shown).

DISCUSSION

Independent of *CFTR* mutations, links between ER stress and CF-related inflammation have been extensively studied, particularly with regard to inositol-requiring enzyme 1 (IRE1 α), and PERK²⁰ pathways. In our previous study, we identified the *CHAC1* mRNA as one of the most highly differentially expressed transcripts between primary bronchial cells from patients with and without CF, infected with *P. aeruginosa*. We also found that CF cells exhibited an expected excessive inflammatory response, including higher IL-8 production¹¹. Because CHAC1 was recently described as a new component of the UPR in the PERK pathway¹², we aimed to evaluate whether CHAC1 was involved in the modulation of the inflammatory response induced by *P. aeruginosa* in lung epithelial cells.

We confirmed our previous transcriptomic data showing that *CHAC1* mRNA was overexpressed in primary non-CF epithelial cells compared with its expression in CF cells at baseline and upon *P. aeruginosa* infection. Additionally, *P. aeruginosa* and two of its virulence factors, LPS and F, were able to induce CHAC1 at the transcriptional level in bronchial epithelial NCI-H292 cells. As previously shown in Neuro2a¹⁸ or HEK cells²¹, we were able to detect CHAC1 protein expression only after MG-132 treatment, suggesting the involvement of the proteasome pathway in the stability of the protein²¹. This induction of *CHAC1* mRNA expression was observed not only with the laboratory strain PAK but also with freshly isolated clinical strains. Interestingly, other bacteria, such as *Stenotrophomonas maltophilia*, another gram-negative bacterium, and *Staphylococcus aureus*, a gram-positive bacterium, which are both known to chronically infect patients with CF, were not able to induce *CHAC1* mRNA expression to similar levels. Using cellular infection models, other transcriptomic studies have consistently shown CHAC1 upregulation with microorganisms, including human coronavirus²², human cytomegalovirus²³, tick-borne flaviviruses²⁴, Zika virus²⁵, and the bacterium *Mycoplasma hominis*²⁶. In these studies, the specific role of CHAC1 was not

investigated. However, CHAC1 is essential as embryonic lethality was observed in mice with deletion of the *Chac1* gene ²⁷.

In our study, *CHAC1* mRNA induction by LPS and *P. aeruginosa* was not related to PERK activation, as is TM, but was dependent on ATF4. In contrast, LPS from *E. coli* has previously been shown to activate both PERK and ATF4 in A549 cells ²⁸. Notably, ATF4 has been shown to be directly recruited by Toll-like receptor 4 independent of ER stress in human monocytes ²⁹. Consistent with our results, another ER stress-associated molecule, GADD34, was recently shown to be upregulated by several virulence factors from *P. aeruginosa*, including pyocyanin and AprA, independent of PERK but dependent on ATF4 ³⁰. Taken together, these results were consistent with emerging evidence showing that induction of the UPR pathway by microorganisms did not reflect ER stress but was an integral part of the immune response ³¹. The fine tuning of immune responses by the UPR has been extensively studied ³². However, its contribution to the regulation of cytokine production in bacterial infection is not well understood ¹⁷. Here, we observed that inhibition of *CHAC1* mRNA expression by siRNA promoted IL-8 and CCL2 expression and PGE₂ secretion, suggesting that CHAC1 prevents excessive inflammatory responses dependent on the NF-κB p65 pathway. These results were consistent with a recent study reporting that bronchial epithelial cells undergoing ER stress showed reduced IL-8 and CXCL1 production in the presence of inflammatory stimuli ³³. Indeed, pretreatment of bronchial epithelial cells with TM (shown here and by others ¹² to be able to increase CHAC1 expression) can prevent IL-8 and CXCL1 production. In contrast, inhibition of *CHAC1* mRNA expression by siRNA inhibits IL-6 production, suggesting that CHAC1 may promote IL-6 expression. Our results were consistent with a previous study showing that TM promotes IL-6 secretion in bronchial IB3-1 (CF deficient) and C38 cells stimulated with F ¹³. Previous works have demonstrated that IL-6 production in A375 skin cells is dependent on CHOP ³⁴. However, CHOP is expected to be upstream in the CHAC1 pathway

and does not explain our results; future studies are needed to determine how the IL-6 pathway is affected specifically in lung epithelial cells.

In addition to its role in UPR, CHAC1, as a member of the γ -glutamylcyclotransferase family, is able to hydrolyze glutathione only in its reduced form (GSH)³⁵. Glutathione has been widely studied owing to the function of CFTR as a glutathione transporter³⁶. GSH homeostasis is defective in CF, and GSH promotes oxidative stress and related inflammation³⁷. The roles of CHAC1 activity in relation to cellular glutathione homeostasis and the observed cytokine regulation remain to be determined, although previous studies have demonstrated that the levels of glutathione-related enzyme can regulate cytokine production³⁸.

In our experiments, PAK did not induce apoptosis in NCI-H292. However, these cells are not completely resistant to apoptosis since staurosporine was able to induce caspase-3 and PARP cleavage. Thus, although CHAC1 was induced by *P. aeruginosa*, it was not sufficient to induce cell apoptosis. It is conceivable that the level of induction of CHAC1 may be too low to promote apoptosis. In contrast, high induction of CHAC1 using an overexpression plasmid led to induction of PARP cleavage, indicative of cell apoptosis. Apoptosis dysfunction is still highly controversial in CF³⁹, and our results are partly consistent with some previous studies. Indeed, even if *P. aeruginosa* has been previously shown to induce apoptosis in lung epithelial cells, variable susceptibility between lung epithelial cells has been observed. Moreover, the PAO1 strain of *P. aeruginosa* has been shown to induce apoptosis in human tracheal 9HTEo cells but not in primary nasal epithelial cells from polyps or in 16HBE14o bronchial cells, which are both resistant⁴⁰. In contrast, other bronchial cell lines are permissive to apoptosis induced by *P. aeruginosa*, such as IB3-1 (F508del/W1282X), C38, S9 (both IB3-1 corrected cells), CFT1-LCFSN, and CFT1-LC3 (F508del) cells. More recently, using Calu-3 polarized lung epithelial cells, researchers showed that PAO1 was able to induce apoptosis markers, such as active caspase-3, within 6–8 h. Additionally, the effects of the *CFTR* genotype on apoptosis of

lung epithelial cells at baseline³⁹ or after *P. aeruginosa* infection are still debated and may be dependent on which specific marker of apoptosis is being evaluated^{40,41}.

In conclusion, we showed that inhibition of CHAC1 in bronchial epithelial cells resulted in the regulation of inflammatory mediators. Moreover, CHAC1 was induced preferentially in normal hAECBs in comparison to CF hAECBs in response to *P. aeruginosa* and its virulence factors, LPS and F. Thus, these results suggest that low CHAC1 expression may contribute to the excessive inflammation observed in CF bronchial epithelial cells after *P. aeruginosa* infection and thus may be associated with the exacerbation of inflammation characterizing the lungs from patients with CF. Inflammation is complex and thought to have a critical impact during the course of CF lung disease⁴². A better understanding of the link between infection and inflammation is thus required for the development of new therapeutics.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

P. aeruginosa (serotype 10) LPS, MG-132, staurosporine solution from *Streptomyces* sp., tobramycin, and dimethyl sulfoxide (DMSO) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Purified *P. aeruginosa* F was from InvivoGen (San Diego, CA, USA), and TM and GSK2656157/PERK inhibitor were from Calbiochem (Merck Millipore, Molsheim, France).

Cell culture

Three cell lines, i.e., human bronchial epithelial cell lines NCI-H292 (ATCC-CRL-1848; Rockville, MD, USA) and BEAS-2B (ATCC-CRL-9609) and the human alveolar epithelial cell line A549, stably transfected with a plasmid containing the NF- κ B promoter coupled with luciferase (A549 NF- κ B luciferase cells; Panomics, Fremont, CA, USA) and primary hAECBs (Epithelix, Plan les Ouates, Switzerland) were used in this study. NCI-H292 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotics (100 IU/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin) at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. A549 NF- κ B luciferase cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) FBS, 1% antibiotics, and 100 μ g/mL hygromycin B at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. Primary hAECBs from patients with CF or healthy donors (Table 1) were cultured with hAECB culture medium (Epithelix), which was changed every 3 days. The cells were seeded in different plates and after reaching confluence and were incubated overnight in DMEM containing 10% FBS and 1% antibiotics before being stimulated in the same medium free of antibiotics.

Bacterial strains, growth conditions, and infection protocols

The *P. aeruginosa* PAK strain used previously⁴³ expresses the full complement of virulence factors, including pili; flagella; the type III secreted exoenzymes S, T, and Y; and a smooth LPS belonging to serotype 6. Two mutants of *P. aeruginosa* PAK strain were also used as described previously⁴⁴, i.e., the mutant ΔFliC with deletion of F and the double mutant ΔpscF ΔxcpQ with deletion of type II and III secretion systems. The different strains of *P. aeruginosa* were grown for 12 h in Luria-Bertani (LB) medium with stirring at 110 rpm, diluted up to 5×10^{-4} -fold, transferred to fresh medium, and grown overnight to the midlog phase with stirring at 110 rpm. The culture was centrifuged at $3,000 \times g$ for 15 min, and the bacterial pellet was washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in 500 μL PBS. The optical density measured at 600 nm was adjusted to give the desired concentration (MOI). Concentrations were verified by serial 10-fold dilutions of the bacterial suspensions and plating on LB agar (Supplementary Figure 3). Cells were infected with *P. aeruginosa* in their culture medium without antibiotics. After each stimulation, supernatants were collected and centrifuged at $3,000 \times g$ for 15 min to remove the bacteria. Clinical strains of *P. aeruginosa* were isolated according to the standards procedures of the microbiological department of St-Antoine Hospital, Paris, France. Sputum from patients was diluted (v/v) with Digest-Eur (Eurobio, Courtaboeuf, France; prediluted at 1/10 with sterile distilled water), vortexed, and incubated for 15 min at room temperature. A 10- μL aliquot was plated on different selective media for 5 days at 37°C under aerobic conditions. *P. aeruginosa* was isolated from Drigalski's agar plates, and identification was confirmed by mass spectrometry (Maldi-Biotyper, Bruker, France). *Stenotrophomonas maltophilia* was freshly isolated from a patient with CF, and its identification was confirmed by mass spectrometry. *Stenotrophomonas maltophilia* and *Staphylococcus aureus* (Newman strain⁴⁵) were cultured similar to *P. aeruginosa*.

CHAC1 and ATF4 inhibition

To induce transient *CHAC1* mRNA inhibition, we performed reverse transfection in NCI-H292 and/or A549 cells with either Silencer Select siRNA for CHAC1 (siRNA CHAC1, s35570) or negative control (siRNA Ctrl) from Ambion (Austin, TX, USA) using HiPerFect transfection reagent (Qiagen, Hilden, Germany). In reverse transfection protocols, cells were seeded either in 96- or 12-well plates and transfected the same day with siRNA (5 nM), which was added to the wells along with HiPerFect. After 48 h of reverse transfection, cells were treated as described in the Figure Legends.

To induce transient *ATF4* mRNA inhibition, we performed transfections in NCI-H292 cells with Silencer Select siRNA for ATF4 (siRNA ATF4, s1702, 5 nM) from Sigma-Aldrich or negative control siRNA (siRNA Ctrl, 5 nM) using Lipofectamine 3000 transfection reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 48 h.

Reverse transcription (RT) quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

RNA was isolated using a NucleoSpin RNA/Protein kit (Macherey Nagel, Duren, Germany) according to the manufacturer's instructions. RT was performed using an ABI high-capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time PCR was performed using an ABI StepOnePlus. Each reaction contained 5 μ L of 2 \times TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems); 3.5 μ L water; 0.5 μ L TaqMan probes for *CHAC1* (Hs_00225520), *IL-8* (Hs_174103), *IL-6* (Hs_985639), *CCL2* (Hs_00234140), and *GAPDH* (Hs_2786624); and cDNA as a template in a final volume of 10 μ L. For relative quantification of the mRNA levels, the amount of each target gene was normalized to the expression of *GAPDH* in control cells as a calibrator and was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Each point corresponded to the mean \pm standard error of the mean (SEM) of n experiments, as indicated in the Figure Legends.

Western blotting

Total proteins were extracted using a NucleoSpin RNA/Protein kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions. An equal amount of proteins was reduced, size-separated on 10% or 13.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, and transferred to nitrocellulose membranes (Invitrogen). The membranes were then blocked in 5% milk in TBS-T (10 mM Tris [pH 7.5], 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and incubated with specific primary antibodies against CHAC1 (1:500, 1 h at room temperature; AV42623; Sigma-Aldrich), PARP (cleaved and uncleaved forms, 1:1,000, overnight at 4°C; 9542; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), ATF4 (1:1,000, overnight at 4°C; 11815; Cell Signaling Technology), cleaved caspase-3 (1:1,000, overnight at 4°C; 9661; Cell Signaling Technology), phospho- and total NF- κ B-p65 (1:1,000, overnight at 4°C; S536 and D14E12; Cell Signaling Technology), and β -actin (1:5,000, 1 h at room temperature; A2228; Sigma-Aldrich). For anti-CHAC1 antibody validation, CHAC1 overexpression was performed with a CHAC1-V5eGFP plasmid (CHAC1-GFP), as previously shown¹². Plasmid DNA was purified using a NucleoBond Xtra Midi/Maxi kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. The CHAC1-GFP plasmid was transfected into NCI-H292 cells using Lipofectamine 3000 transfection reagent (Invitrogen) for 24 h.

Secondary antibodies were purchased from Cell Signaling Technology. Bound antibodies were detected using SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions. Between successive primary antibodies, membranes were treated with Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific). Images were recorded with a Fujifilm LAS-3000 bioimaging system (Fujifilm, Stamford, CT, USA). Quantification was performed with ImageJ 10.2 (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

ELISA

Concentrations of human IL-8, IL-6, and CCL2/MCP-1 were measured in cell supernatants using ELISA kits (DuoSet ELISA kits; Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. The concentration of PGE₂ was measured using ELISA (Cayman, Ann Harbor, MI, USA) following the manufacturer's recommendations. The 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate was from Cell Signaling Technology.

Fluorescence microscopy

CHAC1-GFP expression was monitored in live NCI-H292 cells using an EVOS cell imaging system (Thermo Fisher Scientific).

NF- κ B luciferase activity

NF- κ B luciferase activity in A549 cells was assayed with a Luciferase kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol with a FLUOstar OPTIMA luminometer (BMG LABTECH, Champigny sur Marne, France).

Statistical analysis

Differences among groups were assessed for statistical significance using Prism 7.00 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) as indicated in the Figure Legends. Differences with *p* values of less than 0.05 were considered statistically significant.

Table 1. Characteristics of patients whose hAECBs were used in this study.

| Patient number | Commercial reference | Age (years) | Sex | Smoker | Pathology | <i>CFTR</i> mutation |
|-----------------------|-----------------------------|--------------------|------------|---------------|------------------|-----------------------------|
| P1 | AB60001 | 56 | F | No | No | No |
| P2 | AB037201 | 78 | M | No | No | No |
| P3 | AB39401 | 55 | M | No | No | No |
| P4 | AB68201 | 66 | F | No | No | No |
| P7 | CF56701 | 39 | F | No | CF | F508del |
| P8 | CF60701 | 21 | F | No | CF | F508del |
| P9 | CF45202 | 32 | M | No | CF | F508del |
| P10 | CF60901 | 21 | F | No | CF | F508del |

Acknowledgements

We thank Sarah Fedele for technical assistance. MC received a grant from the French cystic fibrosis nonprofit organizations Vaincre La Mucoviscidose and Gregory Lemarchal. LP received a PhD fellowship from the French cystic fibrosis nonprofit organization Vaincre La Mucoviscidose.

Author contributions

LG, MC, and VB designed the study. LG and LP wrote the manuscript. LP, VB, TF, and HP performed the experiments. LG, LP, and VB performed the data analysis. LT participated in PGE₂ and *Staphylococcus* experiments. DM participated in bacterial sample collection. IM, DM, LT, MC, HC, and VB critically revised the manuscript.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-1080.
2. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073.
3. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059-1065.
4. Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med* 2012; 18: 509-519.
5. Ined VLM. Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données 2015. 2016.
6. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Hoiby N, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 841-851.
7. Berube J, Roussel L, Nattagh L, Rousseau S. Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function enhances activation of p38 and ERK MAPKs, increasing interleukin-6 synthesis in airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 2010; 285: 22299-22307.
8. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1075-1082.
9. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol* 2015; 16: 27-35.

10. Anas AA, van Lieshout MH, Claushuis TA, de Vos AF, Florquin S, de Boer OJ, et al. Lung epithelial MyD88 drives early pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by a flagellin dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016; 311: L219-228.
11. Balloy V, Varet H, Dillies MA, Proux C, Jagla B, Coppee JY, et al. Normal and cystic fibrosis human bronchial epithelial cells infected with *Pseudomonas aeruginosa* exhibit distinct gene activation patterns. *PLoS One* 2015; 10: e0140979.
12. Mungrue IN, Pagnon J, Kohannim O, Gargalovic PS, Lulis AJ. CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade. *J Immunol* 2009; 182: 466-476.
13. Blohmke CJ, Mayer ML, Tang AC, Hirschfeld AF, Fjell CD, Sze MA, et al. Atypical activation of the unfolded protein response in cystic fibrosis airway cells contributes to p38 MAPK-mediated innate immune responses. *J Immunol* 2012; 189: 5467-5475.
14. Kumar A, Tikoo S, Maity S, Sengupta S, Sengupta S, Kaur A, et al. Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as gamma-glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione. *EMBO Rep* 2012; 13: 1095-1101.
15. Park SH, Choi HJ, Yang H, Do KH, Kim J, Lee DW, et al. Endoplasmic reticulum stress-activated C/EBP homologous protein enhances nuclear factor-kappaB signals via repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 2010; 285: 35330-35339.
16. Luciani A, Vilella VR, Esposito S, Brunetti-Pierri N, Medina D, Settembre C, et al. Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 863-875.
17. Smith JA. Regulation of cytokine production by the unfolded protein response; implications for infection and autoimmunity. *Front Immunol* 2018; 9: 422.

18. Oh-Hashi K, Nomura Y, Shimada K, Koga H, Hirata Y, Kiuchi K. Transcriptional and post-translational regulation of mouse cation transport regulator homolog 1. *Mol Cell Biochem* 2013; 380: 97-106.
19. Crawford RR, Prescott ET, Sylvester CF, Higdon AN, Shan J, Kilberg MS, et al. Human CHAC1 protein degrades glutathione, and mRNA induction is regulated by the transcription factors ATF4 and ATF3 and a bipartite ATF/CRE regulatory element. *J Biol Chem* 2015; 290: 15878-15891.
20. Ribeiro CM, Boucher RC. Role of endoplasmic reticulum stress in cystic fibrosis-related airway inflammatory responses. *Proc Am Thorac Soc* 2010; 7: 387-394.
21. Nomura Y, Hirata Y, Kiuchi K, Oh-Hashi K. Translational and post-translational regulation of mouse cation transport regulator homolog 1. *Sci Rep* 2016; 6: 28016.
22. Poppe M, Wittig S, Jurida L, Bartkuhn M, Wilhelm J, Muller H, et al. The NF-kappaB-dependent and -independent transcriptome and chromatin landscapes of human coronavirus 229E-infected cells. *PLoS Pathog* 2017; 13: e1006286.
23. Gurczynski SJ, Das S, Pellett PE. Deletion of the human cytomegalovirus US17 gene increases the ratio of genomes per infectious unit and alters regulation of immune and endoplasmic reticulum stress response genes at early and late times after infection. *J Virol* 2014; 88: 2168-2182.
24. Mlera L, Lam J, Offerdahl DK, Martens C, Sturdevant D, Turner CV, et al. Transcriptome analysis reveals a signature profile for tick-borne flavivirus persistence in HEK 293T cells. *MBio* 2016; 7.
25. Rolfe AJ, Bosco DB, Wang J, Nowakowski RS, Fan J, Ren Y. Bioinformatic analysis reveals the expression of unique transcriptomic signatures in Zika virus infected human neural stem cells. *Cell Biosci* 2016; 6: 42.

26. Hopfe M, Deenen R, Degrandi D, Kohrer K, Henrich B. Host cell responses to persistent mycoplasmas--different stages in infection of HeLa cells with *Mycoplasma hominis*. *PLoS One* 2013; 8: e54219.
27. Mungrue I, Prescott ET, Sylvester CF, Crawford RR. Abstract 324: Knockout of the pro-apoptotic ER-stress gene *Chac1* in mice results in embryonic lethality and activation of the Notch pathway. *Circ Res* 2015; 117: A324-A.
28. Li S, Guo L, Qian P, Zhao Y, Liu A, Ji F, et al. Lipopolysaccharide induces autophagic cell death through the PERK-dependent branch of the unfolded protein response in human alveolar epithelial A549 cells. *Cell Physiol Biochem* 2015; 36: 2403-2417.
29. Zhang C, Bai N, Chang A, Zhang Z, Yin J, Shen W, et al. ATF4 is directly recruited by TLR4 signaling and positively regulates TLR4-triggered cytokine production in human monocytes. *Cell Mol Immunol* 2013; 10: 84-94.
30. van 't Wout EF, van Schadewijk A, van Boxtel R, Dalton LE, Clarke HJ, Tommassen J, et al. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* induce both the unfolded protein and integrated stress responses in airway epithelial cells. *PLoS Pathog* 2015; 11: e1004946.
31. Claudio N, Dalet A, Gatti E, Pierre P. Mapping the crossroads of immune activation and cellular stress response pathways. *EMBO J* 2013; 32: 1214-1224.
32. Grootjans J, Kaser A, Kaufman RJ, Blumberg RS. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2016; 16: 469-484.
33. Tang AC, Saferali A, He G, Sandford AJ, Strug LJ, Turvey SE. Endoplasmic reticulum stress and chemokine production in cystic fibrosis airway cells: regulation by STAT3 modulation. *J Infect Dis* 2017; 215: 293-302.
34. Hattori T, Itoh S, Hayashi H, Chiba T, Takii T, Yoshizaki K, et al. CHOP, a basic leucine zipper transcriptional factor, contributes to the antiproliferative effect of IL-1 on A375 human

melanoma cells through augmenting transcription of IL-6. *J Interferon Cytokine Res* 2001; 21: 323-332.

35. Tsunoda S, Avezov E, Zyryanova A, Konno T, Mendes-Silva L, Pinho Melo E, et al. Intact protein folding in the glutathione-depleted endoplasmic reticulum implicates alternative protein thiol reductants. *Elife* 2014; 3: e03421.

36. Linsdell P, Hanrahan JW. Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol* 1998; 275: C323-326.

37. Galli F, Battistoni A, Gambari R, Pompella A, Bragonzi A, Pilolli F, et al. Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822: 690-713.

38. Haddad JJ, Safieh-Garabedian B, Saade NE, Lauterbach R. Inhibition of glutathione-related enzymes augments LPS-mediated cytokine biosynthesis: involvement of an I κ B/NF- κ B-sensitive pathway in the alveolar epithelium. *Int Immunopharmacol* 2002; 2: 1567-1583.

39. Soleti R, Porro C, Martinez MC. Apoptotic process in cystic fibrosis cells. *Apoptosis* 2013; 18: 1029-1038.

40. Rajan S, Cacalano G, Bryan R, Ratner AJ, Sontich CU, van Heerckeren A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* induction of apoptosis in respiratory epithelial cells: analysis of the effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction and bacterial virulence factors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 304-312.

41. Cannon CL, Kowalski MP, Stopak KS, Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 188-197.

42. Roesch EA, Nichols DP, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis: an update. *Pediatr Pulmonol* 2018.

43. Ramphal R, Balloy V, Huerre M, Si-Tahar M, Chignard M. TLRs 2 and 4 are not involved in hypersusceptibility to acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Immunol* 2005; 175: 3927-3934.
44. Jyot J, Balloy V, Jouvion G, Verma A, Touqui L, Huerre M, et al. Type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: in vivo evidence of a significant role in death due to lung infection. *J Infect Dis* 2011; 203: 1369-1377.
45. Pernet E, Brunet J, Guillemot L, Chignard M, Touqui L, Wu Y. *Staphylococcus aureus* adenosine inhibits sPLA2-IIA-mediated host killing in the airways. *J Immunol* 2015; 194: 5312-5319.

Figure 1.

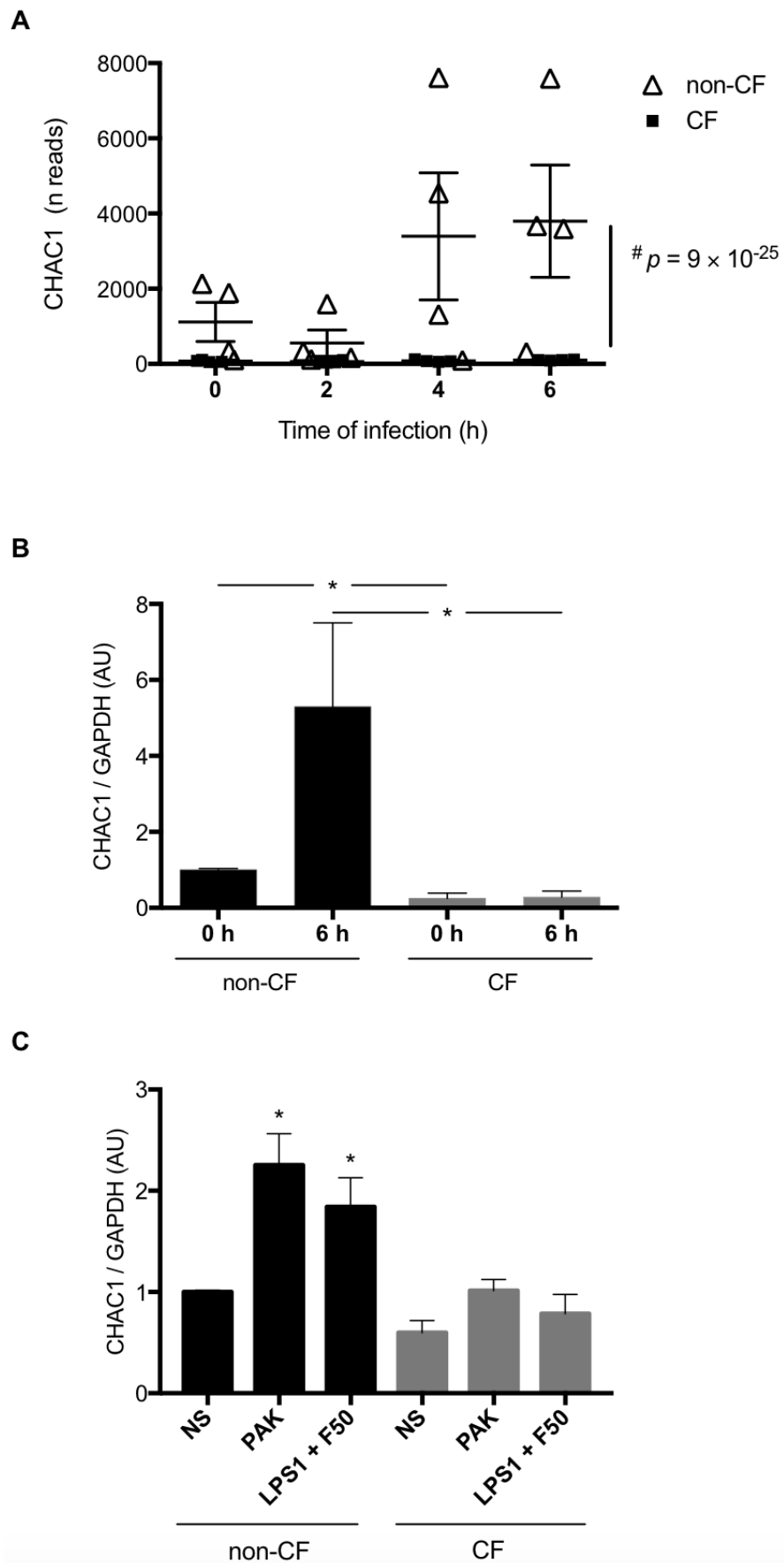


Figure 1. (A) Kinetics of CHAC1 expression measured by RNAseq in hAECBs from patients without CF (N = 4, open triangles) and with CF (N = 4, black squares) infected with *P. aeruginosa* (PAK strain, MOI 0.25) for 0, 2, 4, or 6 h (data were extracted from ref. 11). (B) *CHAC1* mRNA expression measured by qPCR in hAECBs from patients without CF (N = 4, black) and with CF (N = 4, grey) infected with *P. aeruginosa* (PAK strain, MOI 0.25) for 0 or 6 h. Statistical analysis was conducted using Mann-Whitney tests (without versus with CF groups, * $p < 0.05$). (C) *CHAC1* mRNA expression measured by qPCR in hAECBs from patients without CF (black) and with CF (gray) stimulated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS (LPS1) and 50 ng/mL flagellin (F50) or infected with PAK (MOI 0.25) for 6 h. Data are expressed as means \pm SEMs of four independent experiments. Statistical analysis was carried out using analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test (* $p < 0.05$, NS used as the control group).

Figure 2.

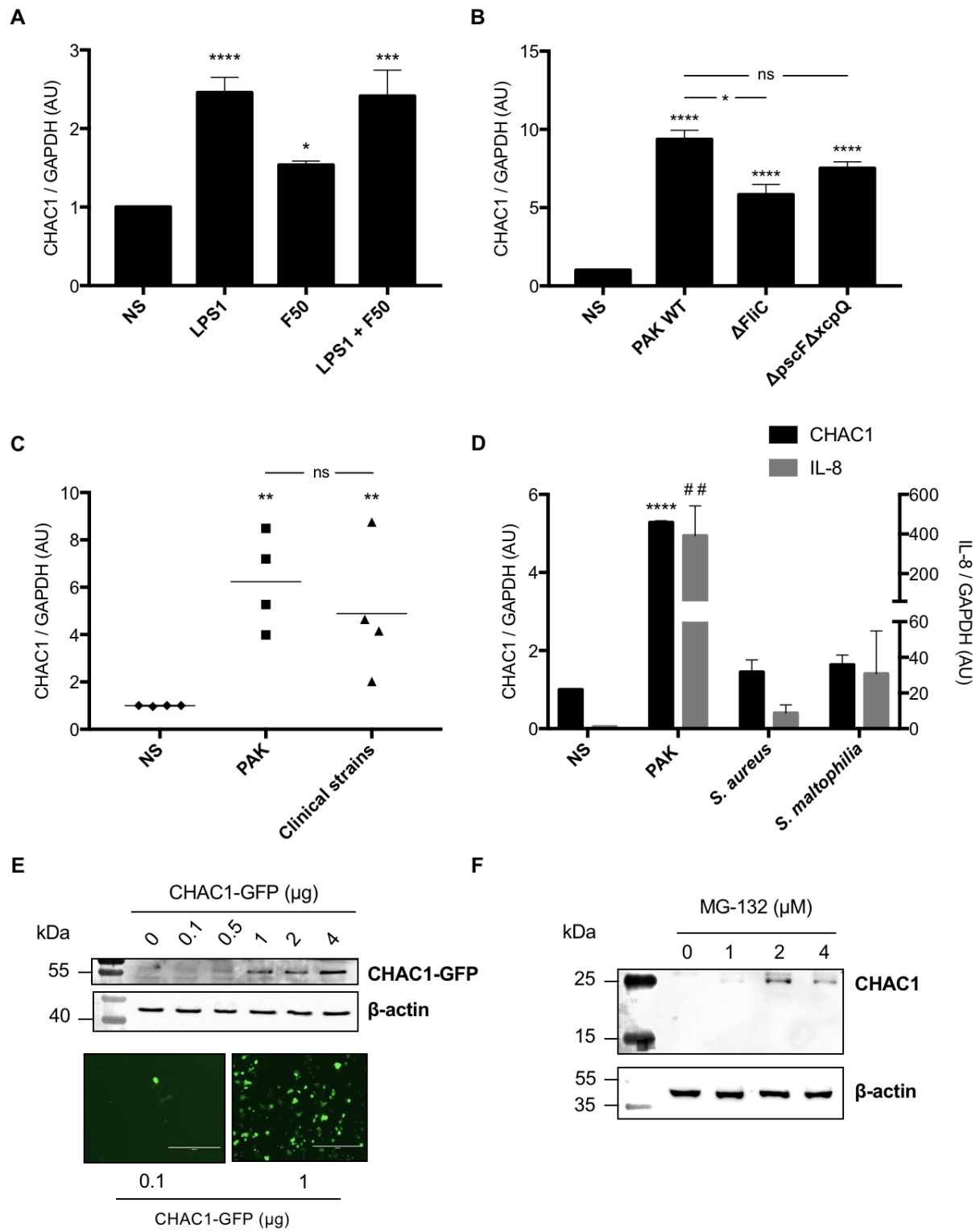


Figure 2. (A) *CHAC1* mRNA expression was measured by qPCR in NCI-H292 cells stimulated with 1 μ g/mL LPS (LPS1) and/or 50 ng/mL flagellin (F50) for 6 h. Data are expressed as the means \pm SEMs of five independent experiments. Statistical analysis was performed using analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test (control group: NS, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). (B) *CHAC1* mRNA expression was measured by qPCR in NCI-H292 cells infected with PAK WT, PAK Δ FliC, or PAK Δ pscF Δ xcpQ (MOI 0.25) for 6 h. Data are expressed as means \pm SEMs of four independent experiments. Statistical analysis was carried out using analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test (control group: NS, * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$). (C) *CHAC1* mRNA expression was measured by qPCR in NCI-H292 cells infected with PAK strain (MOI 0.25) or different clinical strains of *P. aeruginosa* (MOI 0.25) for 6 h. Data are expressed as means \pm SEMs of four independent experiments (NS: diamonds; PAK: squares; clinical strains: triangles). Statistical analysis was carried out using analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test (control group: NS, ** $p < 0.01$). (D) *CHAC1* (black) and *IL-8* (gray) mRNA expression was measured by qPCR in NCI-H292 cells infected with PAK, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), or *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*, MOI 0.25) for 6 h. Data are expressed as means \pm SEMs of three independent experiments. Statistical analysis was carried out using analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test (control group: NS, # # $p < 0.01$ [*IL-8*]; **** $p < 0.0001$ [*CHAC1*]). (E) Western blot analysis of CHAC1 and β -actin protein expression and CHAC1-GFP fluorescence in NCI-H292 cells transfected with increasing amounts of CHAC1-GFP plasmid. (F) Western blot analysis of CHAC1 and β -actin protein expression in NCI-H292 cells treated with increasing concentrations of MG-132 for 6 h.

Figure 3.

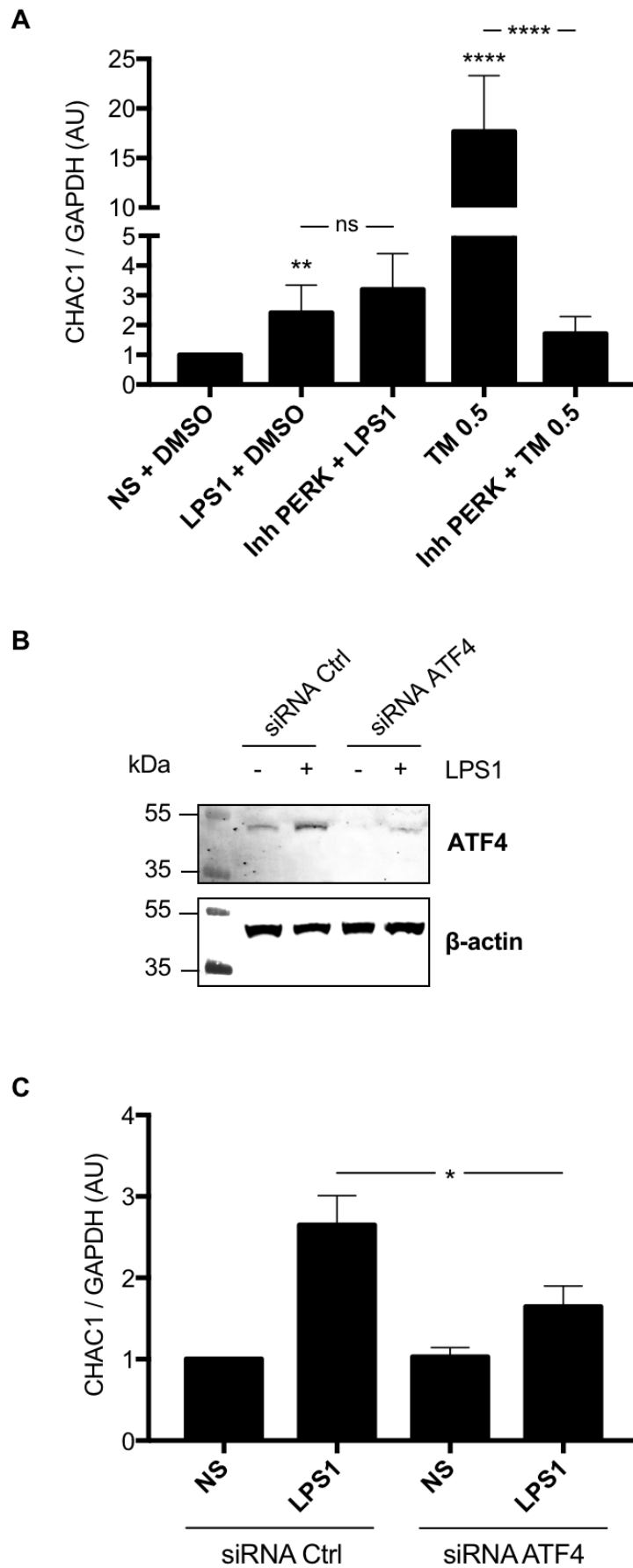
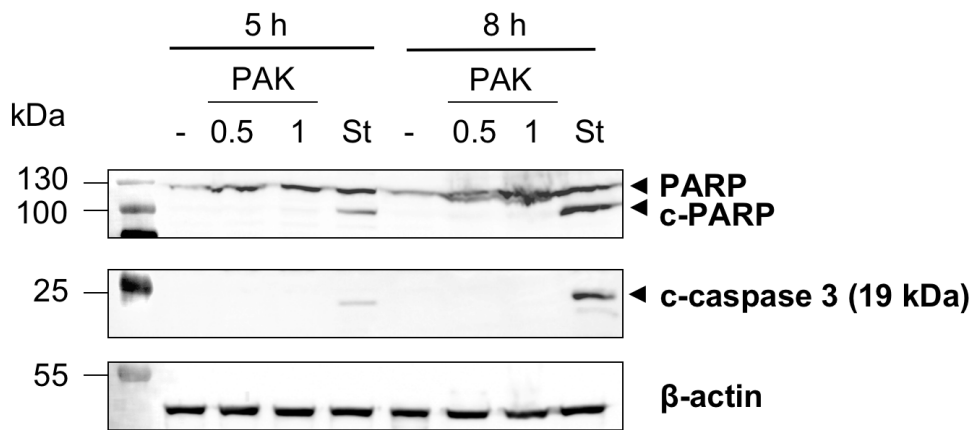


Figure 3. (A) *CHAC1* mRNA expression was measured by qPCR in NCI-H292 cells stimulated with 1 μ g/mL LPS in DMSO (vehicle) or 1 μ M PERK inhibitor (Inh PERK) or stimulated with 0.5 ng/mL tunicamycin (TM) with or without PERK inhibitor for 6 h. Data are expressed as means \pm SEMs of five independent experiments. Statistical analysis was performed with analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test (** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$). **(B)** Western blot analysis of ATF4 expression in NCI-H292 cells treated 48 h with siRNA Ctrl or siRNA ATF4 and stimulated with (+) or without (-) 1 μ g/mL LPS (LPS1) for 1 h (images are representative of six independent experiments). **(C)** *CHAC1* mRNA expression was measured by qPCR in NCI-H292 cells treated for 48 h with siRNA Ctrl or siRNA ATF4 and stimulated with or without (NS) 1 μ g/mL LPS (LPS1) for 1 h. Data are means \pm SEMs of six independent experiments. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney tests (* $p < 0.05$).

Figure 4.

A



B

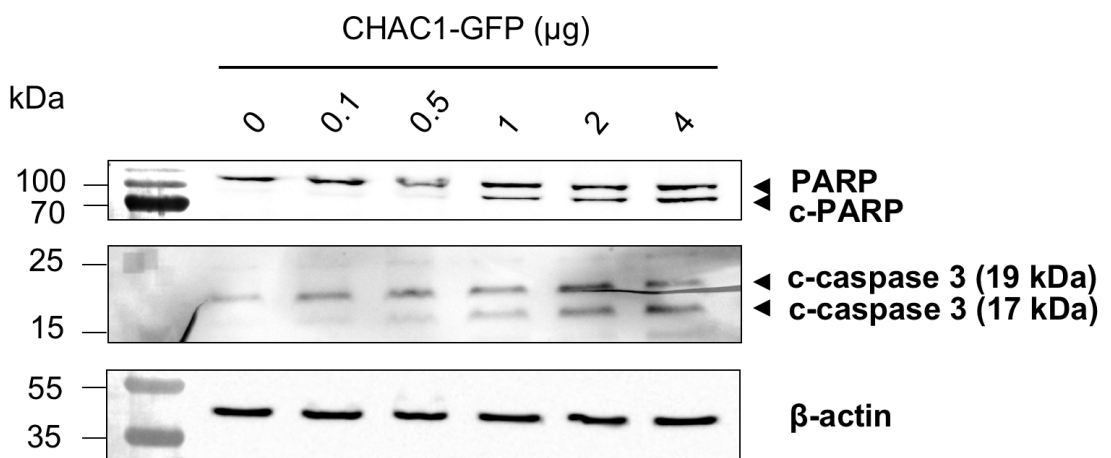


Figure 4. (A) Western blot analysis of PARP (uncleaved form), c-PARP (cleaved form), c-caspase 3 (cleaved form), and β -actin protein expression in NCI-H292 cells infected with PAK (MOI 0.5 or 1) or stimulated with 1 μ M staurosporine (St) for 5 or 8 h. **(B)** Western blot analysis of PARP (uncleaved form), c-PARP (cleaved form), c-caspase 3 (cleaved forms) and β -actin protein expression in NCI-H292 cells transfected with p-CHAC1-GFP (same blot as shown in Figure 2E).

Figure 5.

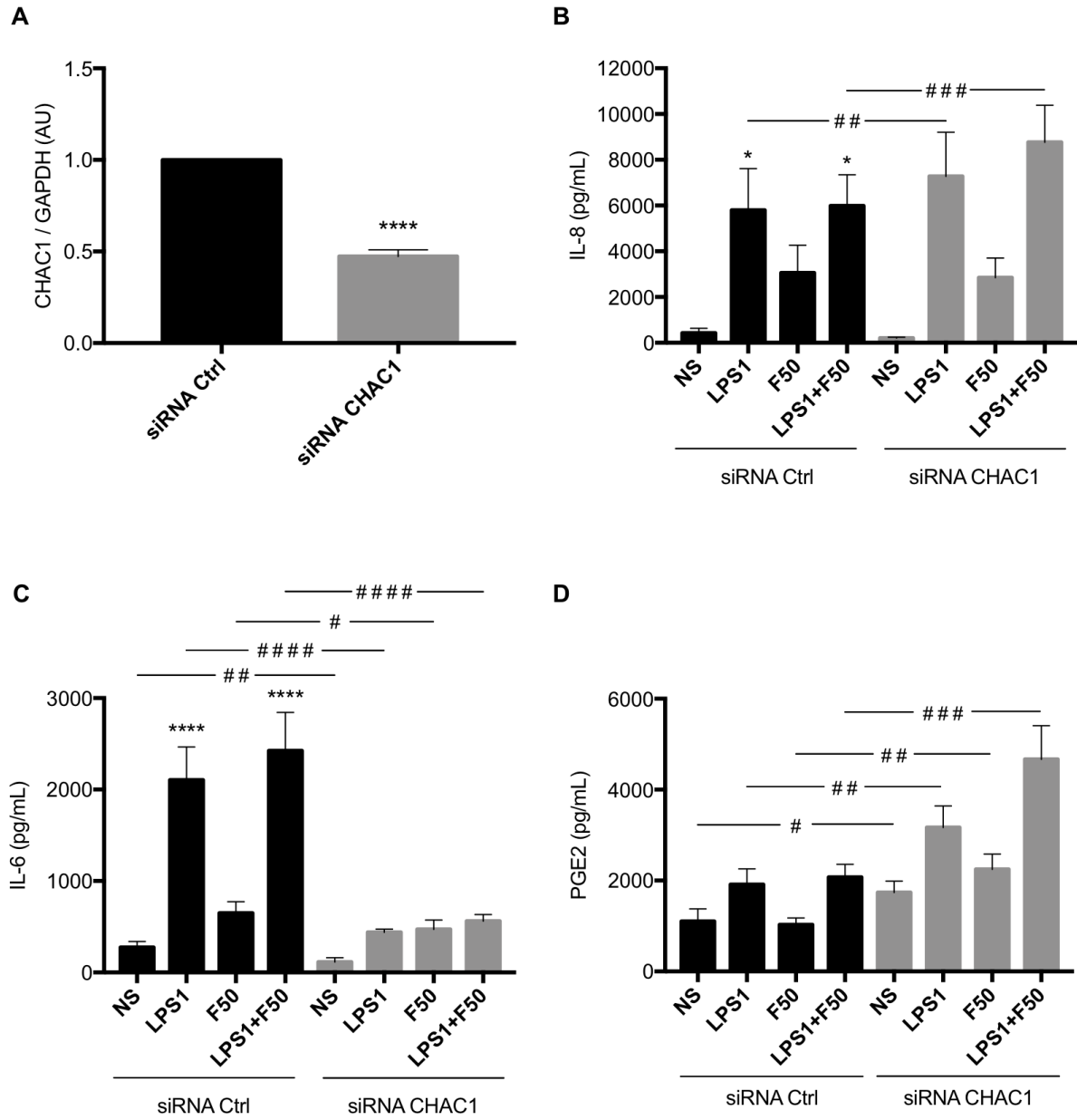


Figure 5. (A) *CHAC1* mRNA expression was measured by qPCR in NCI-H292 cells transfected with siRNA control (siRNA Ctrl, black) or siRNA CHAC1 (gray) for 48 h. Data are expressed as means \pm SEMs of 10 independent experiments. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney tests (**** $p < 0.0001$). (B) IL-8, (C) IL-6, and (D) PGE₂ productions was measured by ELISA in supernatants from cells transfected with siRNA control (siRNA Ctrl, black) or siRNA CHAC1 (gray) for 48 h and stimulated with 1 μ g/mL LPS (LPS1) and/or 50 ng/mL flagellin (F50) for 6 h. Data are expressed as means \pm SEMs of 10 independent experiments. Statistical analysis was performed using analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison tests (control group: NS, * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$) and Wilcoxon tests (siRNA Ctrl versus siRNA CHAC1 groups, # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; #### $p < 0.0001$).

Figure 6.

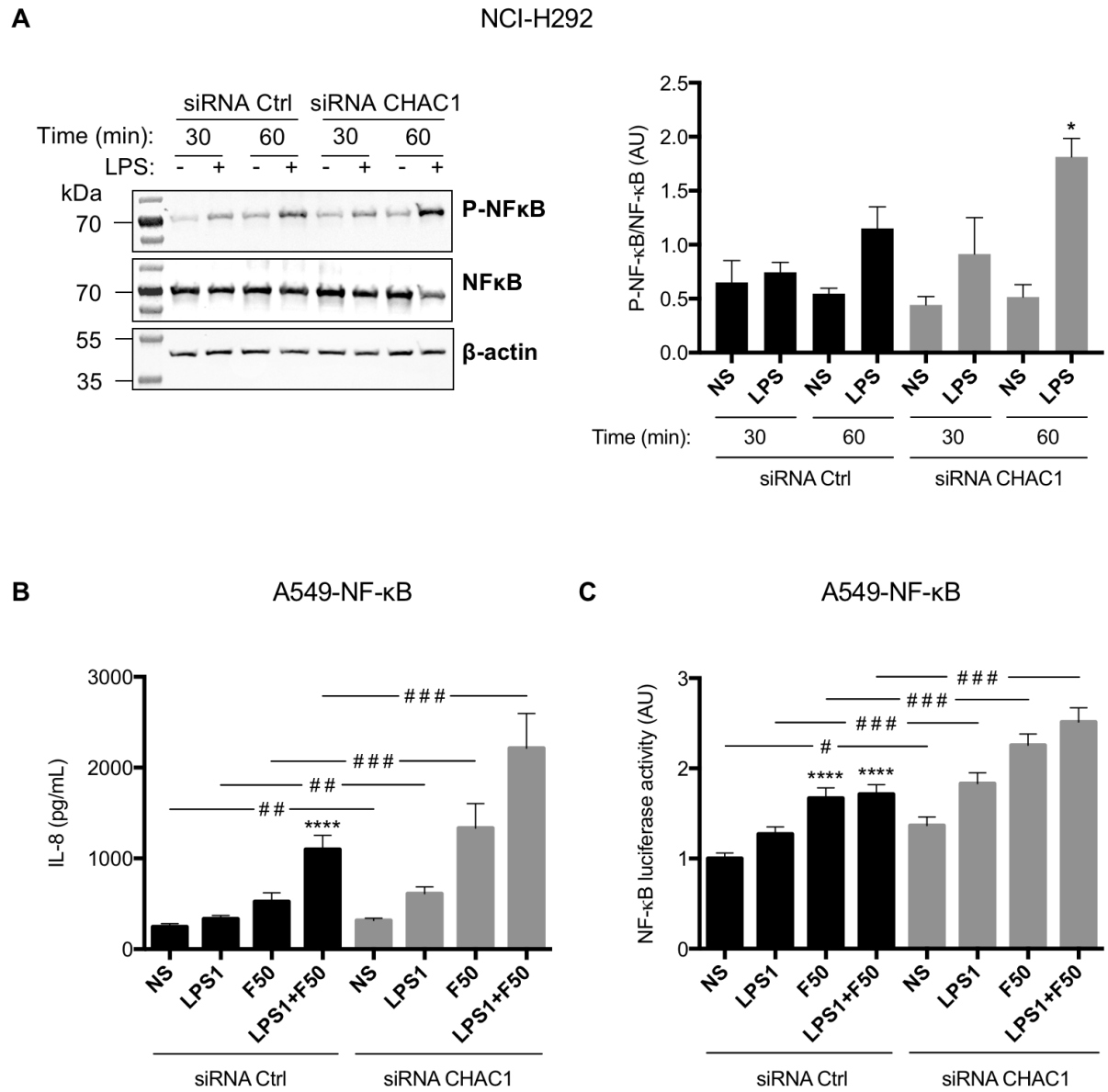
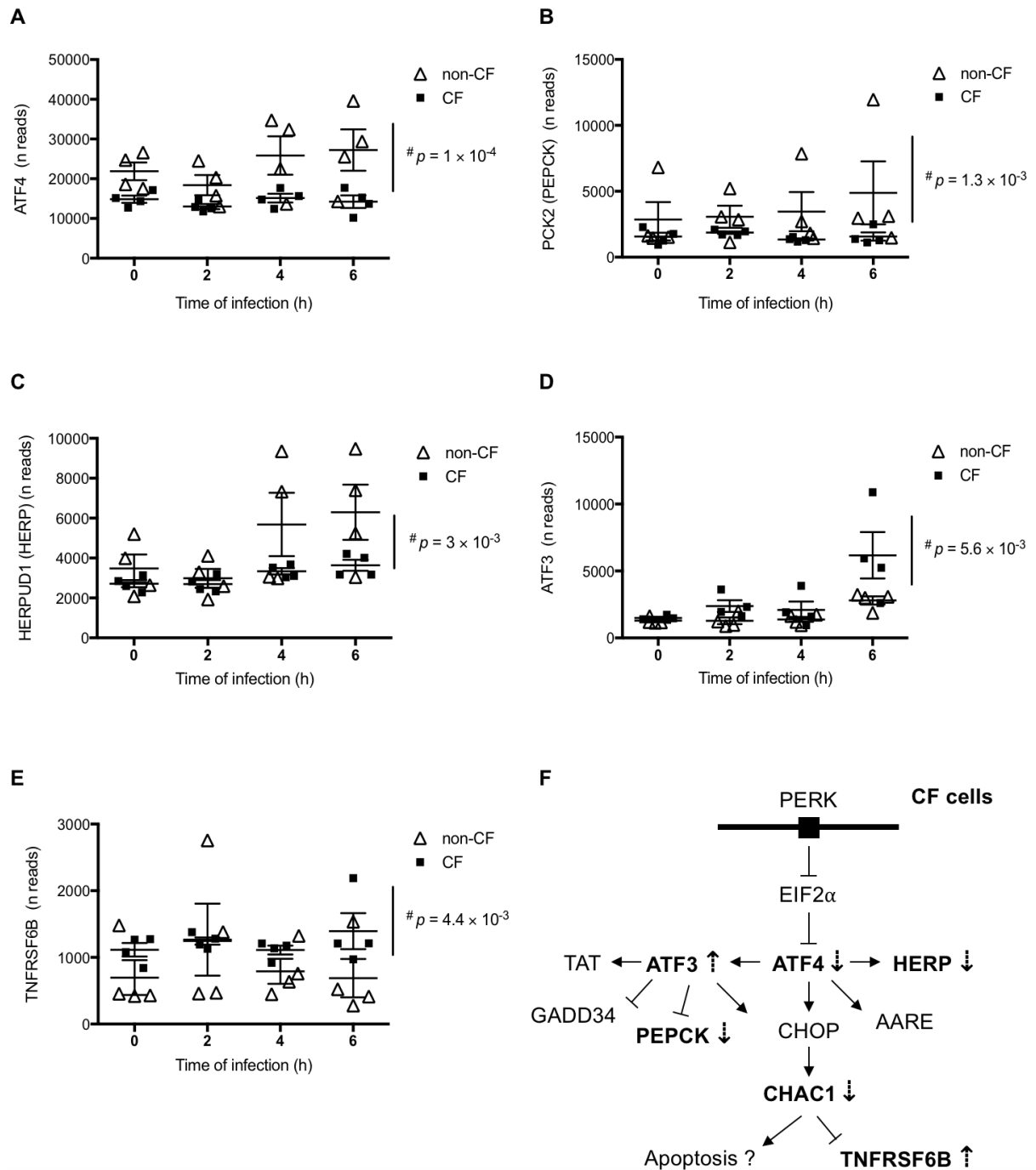


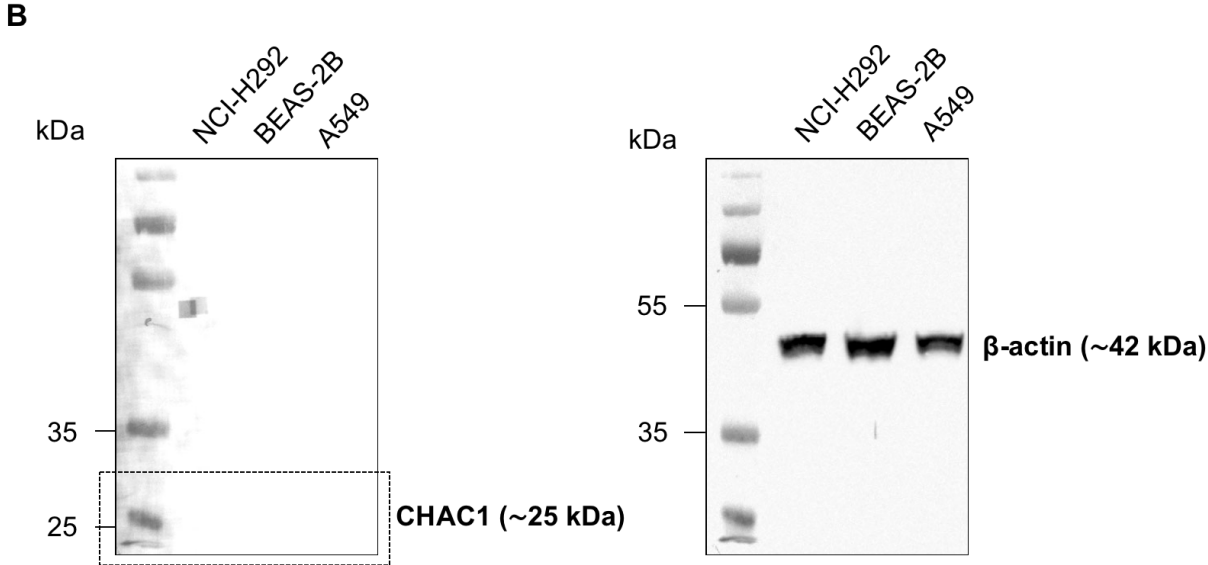
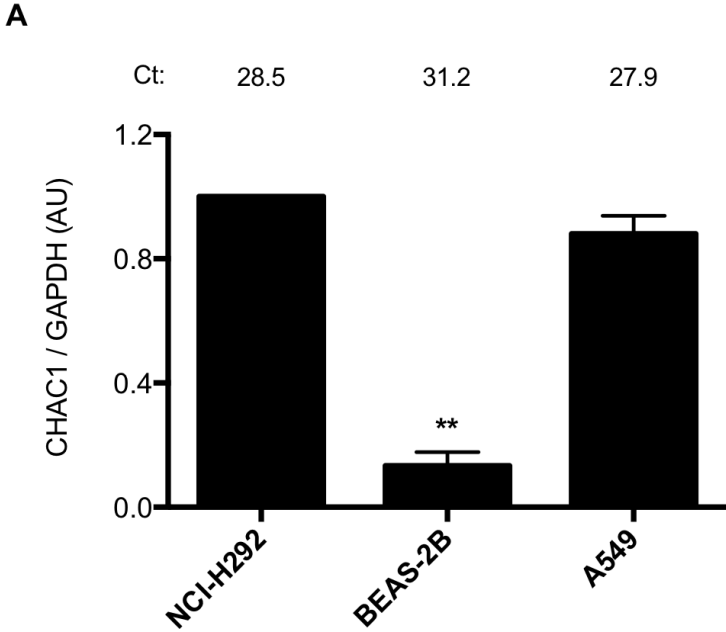
Figure 6. (A) Western blot analysis of phospho-NF- κ B (p-NF- κ B), total NF- κ B (NF- κ B), and β -actin expression in NCI-H292 cells transfected with siRNA control (siRNA Ctrl) or siRNA CHAC1 for 48 h and then stimulated for 30 min or 1 h with (+) or without (-) 1 μ g/mL LPS (images are representative of four independent experiments; left panel). Results are shown as p-NF- κ B/NF- κ B ratios (right panel). Data are expressed as means \pm SEMs of four experiments. Statistical analysis was carried out using Mann-Whitney tests (* $p < 0.05$, siCtrl-LPS 1 h versus siCHAC1-LPS 1 h). (B) IL-8 production and (C) NF- κ B luciferase activity in A549-NF- κ B luciferase cells transfected with siRNA control (siRNA Ctrl, black) or siRNA CHAC1 (gray) for 48 h and stimulated with 1 μ g/mL LPS (LPS1) and/or 50 ng/mL flagellin (F50) for 24 h. Data are expressed as means \pm SEMs of four independent experiments. Statistical analysis was performed using analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison tests (control group: NS, **** $p < 0.0001$) and Wilcoxon test (siRNA Ctrl versus siRNA CHAC1 groups, # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$).

Supplementary Figure 1.



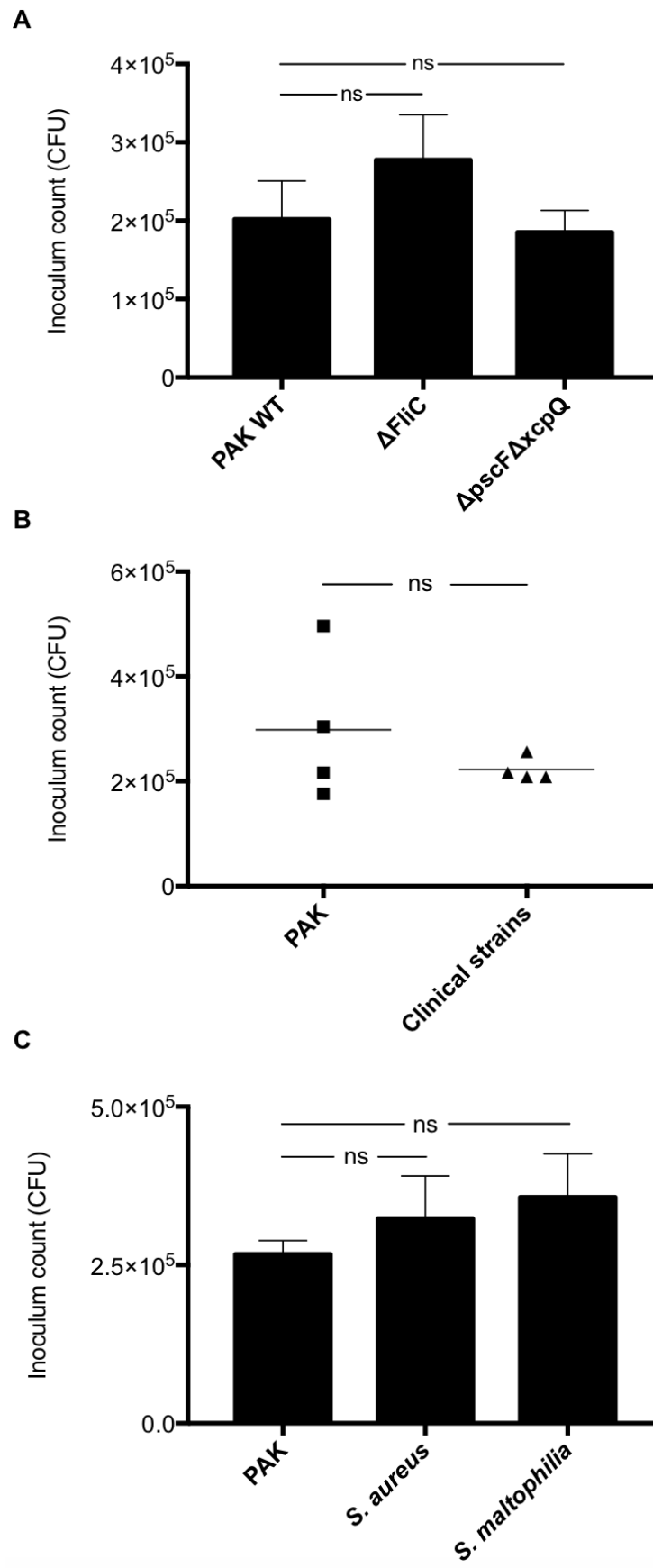
Supplementary Figure 1. Kinetics of **(A)** ATF4, **(B)** PCK2, **(C)** HERPUD1, **(D)** ATF3, and **(E)** TNFRSF6B expression in hAECBs from patients without CF (N = 4, open triangles) and patients with CF (N = 4, black squares) infected with *P. aeruginosa* (PAK strain, MOI 0.25) for 0, 2, 4, or 6 h (data were extracted from ref. 11). **(F)** CHAC1 was associated with the ER stress pathway. Differential expression of mRNAs between cells from patients with or without CF, represented as dotted arrows for upregulated and downregulated mRNAs, respectively.

Supplementary Figure 2.



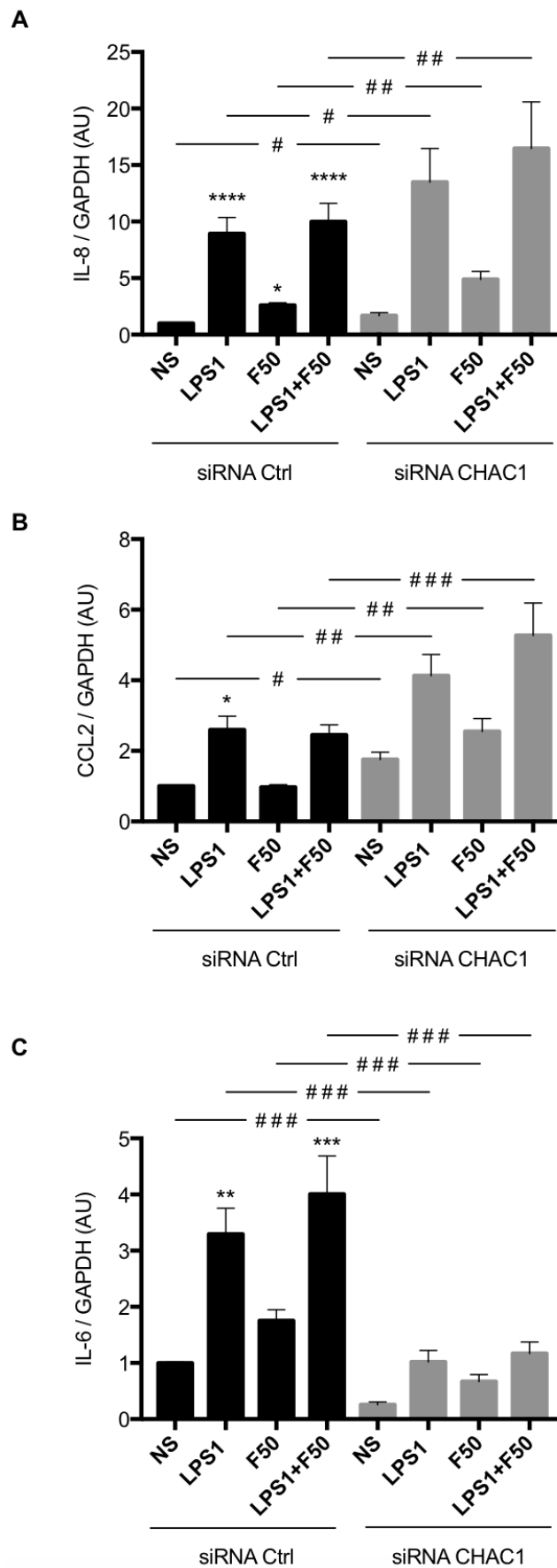
Supplementary Figure 2. (A) *CHAC1* mRNA expression was measured by qPCR, (B) and CHAC1 protein (left panel) was measured by western blotting in NCI-H292, BEAS-2B, and A549 cells. β -Actin (right panel) was measured as a control. Data are expressed as means \pm SEMs of three independent experiments. Statistical analysis was carried out using analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison tests (control: NCI-H292, ** $p < 0.01$).

Supplementary Figure 3.



Supplementary Figure 3. (A) Inoculum count of PAK WT, PAK Δ FliC, or PAK Δ pscF Δ xcpQ (MOI 0.25) used to stimulate NCI-H292 cells in Figure 2B. Data are expressed as means \pm SEMs of four independent experiments. Statistical analysis was performed using analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison tests (control group: PAK WT). (B) Inoculum count of PAK strain (MOI 0.25, squares) or different clinical strains of *P. aeruginosa* (MOI 0.25, triangles) used to stimulate NCI-H292 cells in Figure 2C. Data are expressed as means \pm SEMs of four independent experiments. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney tests. (C) Inoculum counts of PAK, *Staphylococcus aureus*, and *Stenotrophomonas maltophilia* (MOI 0.25) used to stimulate NCI-H292 cells in Figure 2D. Data are expressed as means \pm SEMs of three independent experiments. Statistical analysis was carried out using analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison tests (control group: PAK).

Supplementary Figure 4.



Supplementary Figure 4. (A) *IL-8*, (B) *CCL2*, and (C) *IL-6* mRNA expression was measured by qPCR in NCI-H292 cells transfected with siRNA control (siRNA Ctrl, black) or siRNA CHAC1 (gray) for 48 h and stimulated with 1 μ g/mL LPS (LPS1) and/or 50 ng/mL flagellin (F50) for 6 h. Data are expressed as means \pm SEMs of 10 independent experiments. Statistical analysis was performed using analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison tests (control group: NS, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$) and Wilcoxon tests (siRNA Ctrl versus siRNA CHAC1 groups, # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$).

Supplementary Table 1.

| | 0 h (CF/non-CF) | | 2 h (CF/non-CF) | | 4 h (CF/non-CF) | | 6 h (CF/non-CF) | |
|----------------------------------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| | Log2FC | p (adjBH) | Log2FC | p (adjBH) | Log2FC | p (adjBH) | Log2FC | p (adjBH) |
| DDIT3, ENSG00000175197 | | | | | | | | |
| ATF4, ENSG00000128272 | -0.55 | 3.03 E-02 | | | -0.70 | 6.15 E-03 | -0.87 | 1.47 E-04 |
| ATF3, ENSG00000162772 | | | 0.84 | 2.98 E-02 | | | 0.99 | 5.64 E-03 |
| HSPA5, ENSG00000044574 | | | | | | | | |
| TNFRSF6B, ENSG00000243509 | | | | | | | 1.24 | 4.47 E-03 |
| EIF2A, ENSG00000144895 | | | | | | | | |
| EIF2AK3, ENSG00000172071 | | | | | | | | |
| CCND1, ENSG00000110092 | | | | | | | | |
| PCK2, ENSG00000100889 | | | | | -1.04 | 1.70 E-02 | -1.24 | 1.35 E-03 |
| FBP1, ENSG00000165140 | | | | | | | | |
| CHAC1, ENSG00000128965 | -3.24 | 6.02 E-18 | -2.70 | 3.71 E-08 | -4.29 | 1.82 E-22 | -4.49 | 9.27 E-25 |
| PPP1R15A, ENSG00000087074 | | | | | | | | |
| NFE2L2, ENSG00000116044 | | | | | | | | |
| HERPUD1, ENSG00000051108 | | | | | -0.60 | 2.05 E-02 | -0.69 | 3.04 E-03 |

Supplementary Table 1. Expression of ER stress response mRNAs was measured by RNA-seq analysis in primary hAECBs from patients with CF (N = 4) and without CF (N = 4) during infection by *P. aeruginosa* from 0 to 6 h (PAK strain, MOI 0.25; log₂FC: CF versus non-CF cells; data were extracted from ref. 11). The shaded lines are those for which the results were statistically significant.

Discussion

Chez les patients atteints de mucoviscidose, la mise en place de cycles d'inflammation et d'infection chroniques au niveau des voies aériennes entraîne à long terme la destruction de l'épithélium pulmonaire et une insuffisance respiratoire. L'infection à *P. aeruginosa* est particulièrement précoce et virulente, les traitements par antibiothérapie ne permettant pas une éradication totale du pathogène chez les patients CF. Une étude transcriptomique précédente du laboratoire a permis d'identifier CHAC1 comme l'un des transcrits les plus différenciellement exprimés entre les cellules bronchiques primaires de patients CF et de donneurs sains infectées par *P. aeruginosa* (données extraites à partir de Balloy *et al.* 2015). Nous avons également observé dans ces conditions une réponse inflammatoire excessive des cellules CF, notamment une forte production d'IL-8. CHAC1 a été récemment identifié comme un nouveau composant de la voie UPR du stress du RE dans la voie PERK (Mungrue *et al.* 2009). De façon indépendante des mutations de *CFTR*, les liens entre le stress du RE et l'inflammation chez les patients atteints de mucoviscidose ont déjà été étudiés, en particulier les voies IRE1 α et PERK (Ribeiro et Boucher 2010).

Dans cette étude nous nous sommes donc focalisés sur le rôle de CHAC1 et son implication éventuelle dans la modulation de la réponse inflammatoire induite par l'infection à *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales des poumons.

Expression de CHAC1

Nous avons tout d'abord confirmé les données transcriptomiques qui montrent que *CHAC1* est surexprimé dans les cellules primaires épithéliales bronchiques non-CF par rapport aux cellules CF. De plus nous avons montré que *P. aeruginosa* ainsi que deux de ses facteurs de virulence, le LPS et la flagelline, sont capables d'induire *CHAC1* au niveau transcriptionnel dans les cellules primaires épithéliales bronchiques non-CF ainsi que dans la lignée NCI-H292. Le rôle de la flagelline sur l'induction de CHAC1 a été vérifié grâce à l'utilisation d'une souche PAK de *P. aeruginosa* mutée pour la flagelline Δ FliC. Deux autres facteurs de virulence ont été testés, les systèmes de sécrétion de type II et III de *P. aeruginosa* qui ne semblent pas être impliqués dans l'induction de CHAC1 par *P. aeruginosa* observée dans notre modèle. Cette induction de *CHAC1* en ARNm par *P. aeruginosa* n'est pas restreinte à la souche de laboratoire PAK. En effet, nous avons pu observer une induction similaire de CHAC1 avec des souches cliniques fraîchement isolées. De façon intéressante, nous avons montré qu'une autre bactérie Gram négatif *S. maltophilia* et une bactérie Gram positif *S. aureus*, connues pour

infecter chroniquement les voies aériennes des patients CF, ne sont pas capables d'induire l'expression de *CHAC1* à un niveau semblable à ce qui est observé avec *P. aeruginosa*. De plus, lorsque nous utilisons les mêmes MOI, nous avons observé une production d'IL-8 plus faible des cellules NCI-H292 en réponse à *S. maltophilia* et *S. aureus* en comparaison à *P. aeruginosa*. En utilisant des modèles cellulaires d'infection, d'autres études de transcriptomique ont montré, de façon cohérente avec notre étude, une surexpression de *CHAC1* en réponse à différents micro-organismes notamment le coronavirus humain (Poppe *et al.* 2017), le cytomégalovirus humain (Gurczynski *et al.* 2014), les flavivirus transmis par les tiques (Mlera *et al.* 2016), le virus Zika (Rolfe *et al.* 2016) ainsi que les bactéries *Mycoplasma hominis* (Hopfe *et al.* 2013) et *Chlamydia trachomatis* (Dlugosz *et al.* 2014). De façon très intéressante, une étude de 2007 chez la souris a montré une surexpression de *CHAC1* par une analyse transcriptomique en réponse à l'infection par la souche PAK de *P. aeruginosa* dans des cultures primaires de cellules épithéliales de trachées de souris cultivées en interface air-liquide (Kassim *et al.* 2007). Dans ces études, le rôle spécifique de *CHAC1* n'a pas été investigué. D'autre part, le rôle *in vivo* de *CHAC1* est essentiel puisqu'une létalité embryonnaire est observée chez des souris déficientes pour le gène *Chac1* (Mungrue *et al.* 2015). Une étude très récente a montré une surexpression de *CHAC1* en réponse à l'infection par *H. pylori*, une bactérie Gram négatif flagellée, mettant en jeu le rôle de *CHAC1* comme enzyme dégradant le glutathion (Kumar *et al.* 2012, Wada *et al.* 2018).

Nous avons observé plus de difficultés quant à la validation de l'expression de *CHAC1* au niveau protéique. Des données de la littérature ont montré que *CHAC1* est très instable et rapidement dégradé par le protéasome dans les cellules Neuro2a (Oh-Hashi *et al.* 2013) et HEK 293 (Nomura *et al.* 2016). Dans notre modèle NCI-H292, nous ne sommes pas capables de détecter *CHAC1* au niveau protéique de façon endogène mais seulement en conditions de surexpression grâce à un plasmide de surexpression ou en présence d'un inhibiteur du protéasome, le MG-132, suggérant une implication de la voie de dégradation par le protéasome dans la stabilité de la protéine *CHAC1* par des mécanismes inconnus de nos jours (Nomura *et al.* 2016).

La surexpression de *CHAC1* est dépendante de ATF4 et indépendante de PERK

Nous nous sommes ensuite intéressés à la voie d'activation de *CHAC1* par le LPS. *CHAC1* est un nouveau composant de la voie UPR et plus précisément de la voie PERK/ATF4/CHOP

(Mungrue *et al.* 2009). L'étude transcriptomique du laboratoire (Balloy *et al.* 2015) a montré une induction de *CHAC1* mais également une modulation de différents gènes impliqués dans la voie PERK de l'UPR notamment *ATF4*, *PCK2*, *HERPUD1*, *ATF3* et *TNFRSF6B*. Nous nous sommes donc intéressés à l'implication de PERK et ATF4 dans la voie d'induction de *CHAC1* par le LPS. Nous avons montré que l'induction de *CHAC1* en ARNm par le LPS n'est pas dépendante de PERK comme c'est le cas par la tunicamycine, mais est dépendante de ATF4. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature. En effet, il a été montré que le LPS de *E. coli* est capable d'activer PERK et ATF4 en absence de stress du RE dans les cellules alvéolaires A549 (Li *et al.* 2015) ainsi que chez des souris traitées par voie intrapéritonéale avec du LPS de *E. coli* (Endo *et al.* 2005). De plus, ATF4 a été décrit comme directement recruté par TLR4 indépendamment du stress du RE dans une lignée de monocytes humains (Zhang *et al.* 2013). Certaines données de la littérature montrent cependant un autre lien entre la voie de signalisation initiée par TLR4 et ATF4. Woo et ses collaborateurs ont montré qu'une pré-exposition de monocytes de souris à du LPS entraîne une activation de la voie TLR4 et inhibe sélectivement l'expression de ATF4 et CHOP afin de contrôler le stress du RE prolongé (Woo *et al.* 2009). Cette voie impliquant TLR4 et ATF4 serait cruciale pour enrayer un stress du RE chronique induit par l'infection par des micro-organismes et l'échec de cette voie adaptative pourrait expliquer certaines pathologies caractérisées par une surexpression de CHOP. Une autre molécule associée au stress du RE, GADD34 (molécule en aval de ATF4 dans la voie PERK de l'UPR), a récemment été décrite comme induite par différents facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, notamment la pyocyanine et AprA (protéase alcaline), indépendamment de PERK mais dépendamment de ATF4 dans les cellules épithéliales bronchiques 16HBE14o- (van 't Wout *et al.* 2015). Ces résultats sont donc en accord avec les données émergentes montrant que l'induction de la voie UPR par des micro-organismes ne reflète pas un stress du RE mais une partie intégrante de la réponse immunitaire (Claudio *et al.* 2013).

CHAC1 n'est pas impliqué dans l'apoptose induite par *P. aeruginosa*

Il a été décrit dans la littérature que *CHAC1* joue un rôle dans l'apoptose médiée par le stress du RE et la voie UPR (Mungrue *et al.* 2009). Dans notre étude, nous n'avons pas observé d'induction de l'apoptose par *P. aeruginosa* dans les cellules NCI-H292. Cependant ces cellules ne sont pas complètement résistantes à l'apoptose puisque la staurosporine, un inducteur

chimique de l'apoptose, est capable d'induire le clivage de la caspase-3 et de PARP. Ainsi, bien que CHAC1 soit induit en réponse à l'infection par *P. aeruginosa*, il n'est pas suffisant pour induire l'apoptose des cellules. Il est concevable que le niveau d'induction de CHAC1 soit trop faible pour favoriser l'apoptose. En revanche, une très forte surexpression de CHAC1 à l'aide d'un plasmide conduit à une induction du clivage de PARP reflétant la mise en place de l'apoptose. L'induction de l'apoptose impliquant la voie PERK-CHOP du stress du RE a déjà été étudiée. Il a été montré en 2005, une induction de différents marqueurs de l'apoptose chez des souris traitées par voie intrapéritonéale avec du LPS de *E. coli* (Endo *et al.* 2005). En revanche, l'apoptose induite par une surexpression de CHAC1 n'a été que très peu étudiée. Quelques études existent dans le cadre de différents cancers et drogues chimiothérapeutiques (Joo *et al.* 2012, Joo *et al.* 2015, Chen *et al.* 2017) ainsi que dans un modèle de cataracte chez la souris (Zhou *et al.* 2016). De plus, comme discuté précédemment, la protéine CHAC1 est très instable et rapidement dégradée par le protéasome, ceci pourrait également expliquer nos résultats concernant l'induction de l'apoptose par CHAC1. L'apoptose est toujours très controversée chez les patients atteints de mucoviscidose (Soleti *et al.* 2013) et nos résultats sont en accord avec certaines études. En effet, même s'il a déjà été montré que *P. aeruginosa* est capable d'induire de l'apoptose dans les cellules épithéliales des voies aériennes, une susceptibilité très variable a été décrite entre les différents types de cellules épithéliales pulmonaires. Il a été montré que la souche PAO1 (souche de laboratoire) de *P. aeruginosa* induit l'apoptose dans la lignée cellulaire trachéale humaine 9HTEo- mais pas dans les cellules épithéliales nasales primaires de polype ou la lignée de cellules épithéliales bronchique 16HBE14o- qui sont résistantes à l'apoptose (Rajan *et al.* 2000). Au contraire, d'autres lignées de cellules épithéliales bronchiques sont permissives à l'apoptose induite par *P. aeruginosa* comme les cellules IB3 (F508del/W1282X) et S9 (cellules IB3 corrigées) (Yu *et al.* 2009) ou les cellules CFT1-LCFSN et CFT1-LC3 (F508del/F508del) (Cannon *et al.* 2003). Plus récemment, il a été montré dans les cellules épithéliales pulmonaires polarisées Calu-3, que la souche PAO1 de *P. aeruginosa* est capable d'induire des marqueurs de l'apoptose tels que la caspase-3 active et le marquage fluorescent de l'annexine V après 6 à 8 heures d'infection (Losa *et al.* 2014). Il est également à noter que l'influence du génotype de *CFTR* sur l'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires reste largement controversée et pourrait dépendre du type d'inducteur de l'apoptose (apoptose basale ou induite) ainsi que des marqueurs de l'apoptose observés (Rajan *et al.* 2000, Cannon *et al.* 2003, Soleti *et al.* 2013).

Il a également été décrit dans la littérature, dans une étude sur le glioblastome, que l'induction de CHAC1 entraîne la mise en place d'autophagie, un autre processus de mort cellulaire (Chen *et al.* 2017). Récemment, il a été montré que deux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, le LPS (Li *et al.* 2015) et la pyocyanine (Yang *et al.* 2016), sont capables d'induire la mort cellulaire par autophagie *via* la voie PERK-ATF4 du stress du RE des cellules épithéliales alvéolaires A549 et bronchiques BEAS-2B. Il serait intéressant de vérifier le rôle de CHAC1 dans la mise en place de l'autophagie dans notre modèle d'étude. De plus, une étude de 2010 a montré que les cellules épithéliales humaines des voies aériennes IB3 et CFBE410- (F508del/F508del) présentent un défaut d'autophagie (Luciani *et al.* 2010).

L'apoptose et l'autophagie sont deux processus qui peuvent être induits par un stress oxydant, notamment le stress du RE médié par une déplétion en glutathion (McCullough *et al.* 2001). En plus de son rôle dans la voie UPR du stress du RE, CHAC1 est un membre de la famille γ -glutamylcyclotransférase capable de dégrader le glutathion réduit (GSH) (Kumar *et al.* 2012). Le glutathion a été largement étudié dans le contexte de la mucoviscidose en raison du rôle de CFTR comme transporteur du glutathion (Linsdell et Hanrahan 1998). L'homéostasie du glutathion est altérée chez les patients CF et pourrait promouvoir un stress oxydant et une inflammation associée (Galli *et al.* 2012). De plus, des travaux antérieurs ont montré que les niveaux d'enzymes liées à la biosynthèse du glutathion et donc les variations de niveaux intracellulaires de GSH peuvent réguler la production de cytokines médiée par le LPS en impliquant la production de ROS et la voie de signalisation NF- κ B (Haddad *et al.* 2002). Le rôle de l'activité de CHAC1 sur l'homéostasie du glutathion cellulaire et sur la production de cytokines dans le contexte de la mucoviscidose reste à déterminer. Différentes techniques de dosage du glutathion intracellulaire existent. Il serait néanmoins intéressant de développer un test permettant de mesurer l'activité catalytique de CHAC1, en utilisant son résidu catalytique E¹¹⁶ ou bien en mesurant son produit de catalyse la 5-oxoproline.

CHAC1 régule la réponse inflammatoire induite par le LPS et la flagelline

Enfin au vu du lien qui existe dans la littérature entre stress du RE et inflammation (Grootjans *et al.* 2016) et de la pertinence d'étudier la réponse inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques dans le contexte infectieux de la mucoviscidose, nous nous sommes focalisés sur l'étude du rôle de CHAC1 dans la réponse inflammatoire. La contribution de la réponse UPR dans la régulation de la production de cytokines dans les infections bactériennes n'est pas

aussi bien étudiée que pour les infections virales (Smith 2018). Dans notre étude, nous observons que l'inhibition de *CHAC1* par siRNA dans les cellules NCI-H292 favorise l'expression et la sécrétion de l'IL-8 et l'expression de CCL2 (la sécrétion de CCL2 n'était pas mesurable) en réponse au LPS et à la flagelline de *P. aeruginosa*, suggérant que CHAC1 empêche une inflammation excessive. Ces résultats sont en accord avec une étude récente qui montre que les cellules épithéliales bronchiques CF IB3 et CuFi-1 (F508del/F508del) qui subissent un stress du RE (inducteur chimique), présentent une diminution des sécrétions en IL-8 et CXCL1 au cours d'un stimulus inflammatoire (Tang *et al.* 2017). Une étude de 2013 a également montré chez des souris déficientes pour CHOP (facteur en amont de CHAC1 dans la voie UPR), une inflammation exagérée en réponse au LPS avec notamment une augmentation des niveaux du TNF- α dans le sérum, une augmentation de l'infiltration des neutrophiles, de l'activation de NF- κ B et une augmentation de certains gènes pro-inflammatoires dans les reins des souris (Esposito *et al.* 2013). En revanche, dans notre étude, l'inhibition de *CHAC1* par siRNA dans les cellules NCI-H292 inhibe l'expression et la sécrétion de l'IL-6 en réponse au LPS et à la flagelline de *P. aeruginosa*, ce qui suggère que CHAC1 pourrait favoriser la production d'IL-6. Il a déjà été décrit dans la littérature que l'activation de la voie UPR du stress du RE pouvait entraîner la production de cytokines telles que l'IL-6 (Grootjans *et al.* 2016). Il a notamment été montré dans les macrophages que le facteur de transcription ATF4 lie le promoteur de l'IL-6 pour induire son expression (Iwasaki *et al.* 2014). Des travaux antérieurs ont également montré une surexpression d'IL-6 dans les cellules de peau A375 dépendante de CHOP (Hattori *et al.* 2001) qui lie des protéines qui lorsqu'elles sont libres inhibent la transcription de l'IL-6 (Hattori *et al.* 2003). Il a aussi été montré qu'une activation pharmacologique de la voie PERK de l'UPR par la tunicamycine accentue la sécrétion d'IL-6 en réponse à la flagelline de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales bronchiques IB3 et C38 (Blohmke *et al.* 2012). De plus, une étude récente a montré que la surexpression d'IL-6 dans les cellules épithéliales pulmonaires favoriserait la résistance à l'infection par *P. aeruginosa* (Saint-Criq *et al.* 2018). Cependant, les facteurs CHOP et ATF4 impliqués dans la production d'IL-6 sont en amont de CHAC1 dans la voie UPR, ainsi cela n'explique pas nos résultats et des travaux futurs sont à prévoir pour déterminer comment la voie de l'IL-6 est affectée spécifiquement dans les cellules épithéliales des voies aériennes.

CHAC1 régule l'activation de la voie NF-κB

L'infection exagérée et chronique présente chez les patients CF est associée à une augmentation de l'activation du facteur NF-κB (Tirouvanziam *et al.* 2000, Eidelman *et al.* 2001). Nous avons montré que l'inhibition de *CHAC1* par siRNA dans les cellules NCI-H292 induit une augmentation de la phosphorylation de NF-κB p65 en réponse au LPS. Nous avons confirmé ces résultats dans les cellules A549 exprimant de façon stable le gène *NF-κB*-luciférase. L'inhibition de *CHAC1* par siRNA dans ces cellules favorise l'activité luciférase de NF-κB et la sécrétion d'IL-8 en réponse au LPS et à la flagelline de *P. aeruginosa*. Dans ce modèle, les sécrétions d'IL-6 et de CCL2 n'étaient pas détectables. Ces résultats suggèrent que *CHAC1* régule l'activation de la voie NF-κB et la production de cytokines pro-inflammatoires associées.

Pour valider ces résultats concernant la réponse inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques à l'infection à *P. aeruginosa*, il serait intéressant de regarder les conséquences d'une surexpression de *CHAC1* sur l'activation de la voie NF-κB et la production de cytokines pro-inflammatoires dans ce contexte.

Pour induire une surexpression de *CHAC1*, il serait intéressant d'utiliser le farnésol. Une étude de 2015, a montré que le farnésol, un isoprénoïde retrouvé dans les fruits et les huiles essentielles de nombreuses plantes et drogue anti-cancéreuse utilisée dans le traitement de certains cancers, permettrait d'activer la voie ATF4-ATF3-CHOP-*CHAC1* de l'UPR et une apoptose associée (Joo *et al.* 2015). Il serait donc intéressant de tester cette molécule naturelle dans notre modèle pour permettre d'approfondir nos résultats concernant le rôle de *CHAC1* et éventuellement imaginer une visée thérapeutique de l'utilisation du farnésol chez les patients atteints de mucoviscidose.

L'épithélium pulmonaire des patients CF subit des agressions répétées d'origine bactérienne et inflammatoire entraînant la mise en place de lésions et donc de mécanismes de réparation qui, dans le cas de la mucoviscidose, sont mal contrôlés et induisent l'apparition de zones de remaniement épithélial (Schiller *et al.* 2010). Étant donné le rôle de *CHAC1* dans différents cancers et dans des mécanismes impliquant la migration et la prolifération cellulaire (Goebel *et al.* 2012, Joo *et al.* 2015, Mazzio *et al.* 2017, Qiu *et al.* 2017, Sun *et al.* 2017), notamment la voie Notch critique pour le maintien de la prolifération cellulaire (Chen *et al.* 2017) et les

défauts de réparation de l'épithélium pulmonaire observés chez les patients CF, il serait intéressant d'étudier le rôle de CHAC1 dans la prolifération et la migration cellulaire.

Enfin, après l'étude du rôle de CHAC1 au sein des cellules épithéliales des voies aériennes, il serait intéressant de comprendre l'origine de la dérégulation de CHAC1 dans les cellules CF. Une des hypothèses est que cette dérégulation serait due à l'expression différentielle de microARNs dans les cellules CF. En parallèle de l'étude du transcriptome qui a permis d'identifier CHAC1, le laboratoire a également effectué une étude du miRNome (étude de tous les microARNs) de cellules épithéliales bronchiques primaires CF et non-CF infectées par *P. aeruginosa*. Il serait donc intéressant d'analyser ces données afin de pouvoir identifier des microARNs dérégulés dans ces conditions expérimentales. L'analyse du miRNome combinée à des analyse bio-informatiques nous permettrait de sélectionner des microARNs qui cibleraient potentiellement CHAC1 et seraient responsable de sa dérégulation au sein des cellules CF. Le microARN-370 a été décrit dans la littérature comme ciblant CHAC1 (Stelzer *et al.* 2011), l'étudier serait donc pertinent dans comme perspective de ce travail.

La dérégulation de CHAC1 au sein des cellules CF pourrait également être due à la déficience de CFTR qui ne permettrait pas aux cellules épithéliales des voies aériennes de mettre en place une réponse adéquate pour lutter contre les cycles d'infection et d'inflammation chroniques caractéristiques de la mucoviscidose. Il serait intéressant de pouvoir moduler l'expression de CFTR dans des cellules épithéliales bronchiques CF afin d'observer les éventuelles conséquences sur l'expression de CHAC1.

En conclusion, ce travail a permis d'identifier une régulation de CHAC1 au sein des cellules épithéliales bronchiques des voies aériennes en réponse à l'infection par *P. aeruginosa* altérée chez les patients atteints de mucoviscidose. Nous avons montré que CHAC1 est induit dans les cellules épithéliales bronchiques non-CF en réponse à l'infection par *P. aeruginosa* et ses facteurs de virulence, le LPS et la flagelline. Cette induction est indépendante de PERK mais dépendante de ATF4. Nous avons pu montrer, au niveau protéique, que CHAC1 est rapidement instable et rapidement dégradé par le protéasome dans ces cellules. Nous n'avons pas pu mettre en évidence un rôle de CHAC1 dans la mise en place de l'apoptose dans les cellules épithéliales bronchiques. Enfin, nous avons mis en évidence que l'inhibition de CHAC1

dans les cellules épithéliales bronchiques non-CF résulte en une régulation de la réponse inflammatoire impliquant la voie de signalisation NF- κ B (Figure 32).

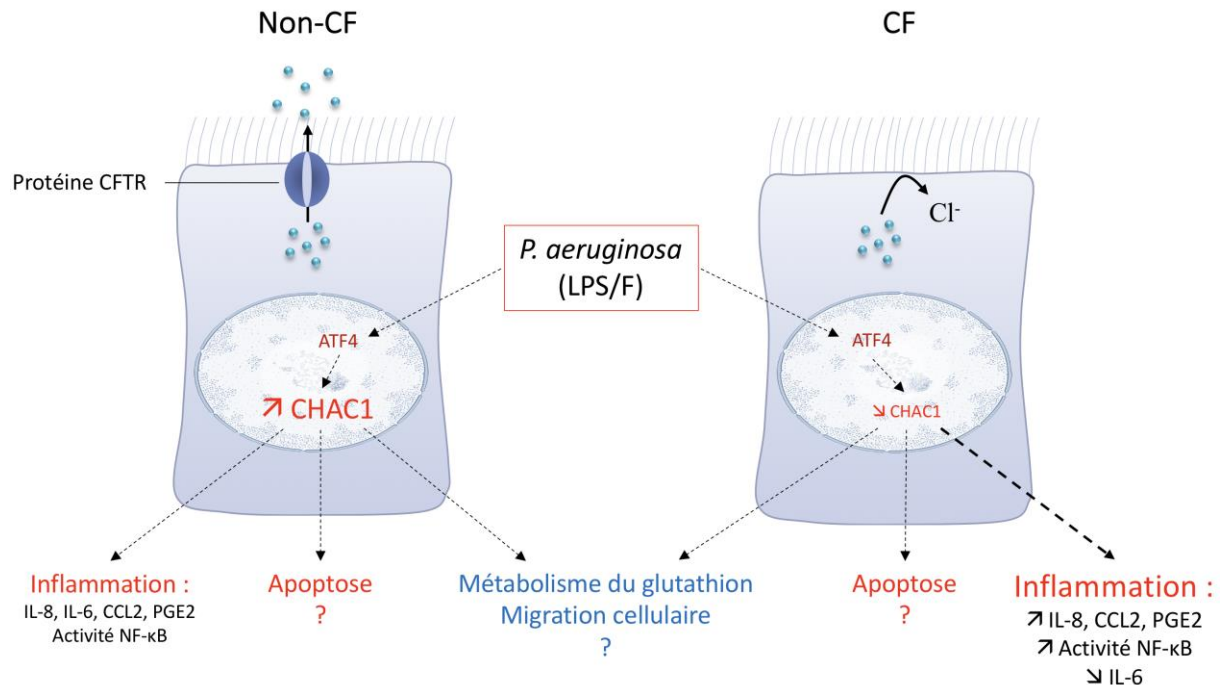


Figure 32 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus, des perspectives et hypothèses du projet.
Cellules non-CF : Nous avons montré que CHAC1 est induit par *P. aeruginosa* ainsi que par le LPS et la flagelline. Cette induction est dépendante de ATF4 et va entraîner une réponse inflammatoire des cellules impliquant la voie de signalisation de NF- κ B. **Cellules CF :** CHAC1 est sous-exprimé à l'état basal par rapport aux cellules non-CF et n'est pas induit en réponse à l'infection par *P. aeruginosa*. Cette diminution de l'expression de CHAC1 serait à l'origine d'une augmentation plus importante de la sécrétion d'IL-8, de CCL2 et de PGE2 et d'une inhibition de la sécrétion d'IL-6.
 Le rôle de CHAC1 dans la mise en place de l'apoptose n'a pas été démontré. L'implication de CHAC1 dans le métabolisme du glutathion et la migration cellulaire reste à déterminer.

Ces résultats suggèrent que CHAC1 pourrait contribuer à la réponse inflammatoire excessive des cellules épithéliales bronchiques des patients atteints de mucoviscidose vis-à-vis de l'infection à *P. aeruginosa* et serait donc une cible thérapeutique potentielle dans la mucoviscidose.

Références bibliographiques

- Abdul-Rasheed, O. F., G. A. Al-Shamma et B. H. Zillo (2010). "Serum gamma-glutamyltransferase as Oxidative Stress Marker in Pre-and Postmenopausal Iraqi Women." Oman Med J **25**(4): 286-288.
- Abou-Ghali, M. et J. Stiban (2015). "Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis." Saudi J Biol Sci **22**(6): 760-772.
- Ahmad, A., A. Ahmed et P. Patrizio (2013). "Cystic fibrosis and fertility." Curr Opin Obstet Gynecol **25**(3): 167-172.
- Alonso y de los Ruyzes de Fonteca, J. (1606). "Diez Privilegios para Mgeres Preñadas." : 212.
- Andersen, D. H. (1938). "Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study." Am J Dis Child **56**: 344-399.
- Andersen, D. H. et R. C. Hodges (1946). "Celiac syndrome. V. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology." Am J Dis Child **72**: 62-80.
- Anderson, M. P., H. A. Berger, D. P. Rich, R. J. Gregory, A. E. Smith et M. J. Welsh (1991). "Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel." Cell **67**(4): 775-784.
- Anderson, M. P., R. J. Gregory, S. Thompson, D. W. Souza, S. Paul, R. C. Mulligan, A. E. Smith et M. J. Welsh (1991). "Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity." Science **253**: 202-205.
- Anderson, M. P., R. J. Gregory, S. Thompson, D. W. Souza, S. Paul, R. C. Mulligan, A. E. Smith et M. J. Welsh (1991). "Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity." Science **253**(5016): 202-205.
- Antunes, M. A., M. M. Morales, P. Pelosi, P. Rieken et M. Rocco (2013). Lung Resident Stem Cells. Resident Stem Cells and Regenerative Therapy: 105-122.
- Ashton, K. J., M. E. Reichelt, S. J. Mustafa, B. Teng, C. Ledent, L. M. Delbridge, P. A. Hofmann, R. R. Morrison et J. P. Headrick (2017). "Transcriptomic effects of adenosine 2A receptor deletion in healthy and endotoxemic murine myocardium." Purinergic Signal **13**(1): 27-49.
- Bachawat, A. K. et A. Kaur (2017). "Glutathione Degradation." Antioxid Redox Signal **27**(15): 1200-1216.
- Bachawat, A. K. et S. Yadav (2018). "The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the gamma-glutamyl cycle." IUBMB Life.

- Ballatori, N., S. M. Krance, S. Notenboom, S. Shi, K. Tieu et C. L. Hammond (2009). "Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases." Biol Chem **390**(3): 191-214.
- Balloy, V., H. Varet, M. A. Dillies, C. Proux, B. Jagla, J. Y. Coppee, O. Tabary, H. Corvol, M. Chignard et L. Guillot (2015). "Normal and Cystic Fibrosis Human Bronchial Epithelial Cells Infected with *Pseudomonas aeruginosa* Exhibit Distinct Gene Activation Patterns." PLoS One **10**(10): e0140979.
- Balough, K., M. McCubbin, M. Weinberger, W. Smits, R. Ahrens et R. Fick (1995). "The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis." Pediatr Pulmonol **20**(2): 63-70.
- Bartoszewski, R., A. Rab, A. Jurkuvenaite, M. Mazur, J. Wakefield, J. F. Collawn et Z. Bebok (2008). "Activation of the unfolded protein response by deltaF508 CFTR." Am J Respir Cell Mol Biol **39**(4): 448-457.
- Bayer, A. S., D. P. Speert, S. Park, J. Tu, M. Witt, C. C. Nast et D. C. Norman (1991). "Functional role of mucoid exopolysaccharide (alginate) in antibiotic-induced and polymorphonuclear leukocyte-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*." Infect Immun **59**(1): 302-308.
- Bertolotti, A., Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding et D. Ron (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." Nat Cell Biol **2**(6): 326-332.
- Berube, K., Z. Prytherch, C. Job et T. Hughes (2010). "Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models." Toxicology **278**(3): 311-318.
- Bhagirath, A. Y., Y. Li, D. Somayajula, M. Dadashi, S. Badr et K. Duan (2016). "Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection." BMC Pulm Med **16**(1): 174.
- Birrer, P. (1995). "Proteases and antiproteases in cystic fibrosis: pathogenetic considerations and therapeutic strategies." Respiration **62 Suppl 1**: 25-28.
- Bishop, C., V. M. Hudson, S. C. Hilton et C. Wilde (2005). "A pilot study of the effect of inhaled buffered reduced glutathione on the clinical status of patients with cystic fibrosis." Chest **127**(1): 308-317.
- 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 et S. E. Turvey (2012). "Atypical activation of the unfolded protein response in cystic fibrosis airway cells contributes to p38 MAPK-mediated innate immune responses." J Immunol **189**(11): 5467-5475.

- Botta, D., C. C. Franklin, C. C. White, C. M. Krejsa, M. J. Dabrowski, R. H. Pierce, N. Fausto et T. J. Kavanagh (2004). "Glutamate-cysteine ligase attenuates TNF-induced mitochondrial injury and apoptosis." Free Radic Biol Med **37**(5): 632-642.
- Boucher, R. C. (2002). "An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease." Adv Drug Deliv Rev **54**(11): 1359-1371.
- Boucher, R. C., M. J. Stutts, M. R. Knowles, L. Cantley et J. T. Gatzky (1986). "Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation." J Clin Invest **78**(5): 1245-1252.
- Bower, N. I. et I. A. Johnston (2010). "Discovery and characterization of nutritionally regulated genes associated with muscle growth in Atlantic salmon." Physiol Genomics **42A**(2): 114-130.
- Bragonzi, A., H. Horati, L. Kerrigan, N. I. Lore, B. J. Scholte et S. Weldon (2018). "Inflammation and host-pathogen interaction: Cause and consequence in cystic fibrosis lung disease." J Cyst Fibros **17**(2S): S40-S45.
- Brown, R. K., H. Wyatt, J. F. Price et F. J. Kelly (1996). "Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress." Eur Respir J **9**(2): 334-339.
- Busch, R. (1990). "On the history of cystic fibrosis." Acta Univ Carol Med (Praha) **36**(1-4): 13-15.
- Cannon, C. L., M. P. Kowalski, K. S. Stopak et G. B. Pier (2003). "Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." Am J Respir Cell Mol Biol **29**(2): 188-197.
- Cantin, A. M., S. L. North, R. C. Hubbard et R. G. Crystal (1987). "Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione." J Appl Physiol (1985) **63**(1): 152-157.
- Castellani, C., H. Cuppens, M. Macek, Jr., J. J. Cassiman, E. Kerem, P. Durie, E. Tullis, B. M. Assael, C. Bombieri, A. Brown, T. Casals, M. Claustres, G. R. Cutting, E. Dequeker, J. Dodge, I. Doull, P. Farrell, C. Ferec, E. Girodon, M. Johannesson, B. Kerem, M. Knowles, A. Munck, P. F. Pignatti, D. Radojkovic, P. Rizzotti, M. Schwarz, M. Stuhmann, M. Tzetic, J. Zielenski et J. S. Elborn (2008). "Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice." J Cyst Fibros **7**(3): 179-196.
- Castranova, V., J. Rabovsky, J. H. Tucker et P. R. Miles (1988). "The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte." Toxicol Appl Pharmacol **93**(3): 472-483.

- Chen, J., M. Kinter, S. Shank, C. Cotton, T. J. Kelley et A. G. Ziady (2008). "Dysfunction of Nrf-2 in CF epithelia leads to excess intracellular H₂O₂ and inflammatory cytokine production." PLoS One **3**(10): e3367.
- Chen, M. S., S. F. Wang, C. Y. Hsu, P. H. Yin, T. S. Yeh, H. C. Lee et L. M. Tseng (2017). "CHAC1 degradation of glutathione enhances cystine-starvation-induced necroptosis and ferroptosis in human triple negative breast cancer cells via the GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway." Oncotarget **8**(70): 114588-114602.
- Chen, P. H., W. L. Shen, C. M. Shih, K. H. Ho, C. H. Cheng, C. W. Lin, C. C. Lee, A. J. Liu et K. C. Chen (2017). "The CHAC1-inhibited Notch3 pathway is involved in temozolomide-induced glioma cytotoxicity." Neuropharmacology **116**: 300-314.
- Chi, Z., J. Zhang, A. Tokunaga, M. M. Harraz, S. T. Byrne, A. Dolinko, J. Xu, S. Blackshaw, N. Gaiano, T. M. Dawson et V. L. Dawson (2012). "Botch promotes neurogenesis by antagonizing Notch." Dev Cell **22**(4): 707-720.
- Claudio, N., A. Dalet, E. Gatti et P. Pierre (2013). "Mapping the crossroads of immune activation and cellular stress response pathways." EMBO J **32**(9): 1214-1224.
- Connor, J. H., D. C. Weiser, S. Li, J. M. Hallenbeck et S. Shenolikar (2001). "Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1." Mol Cell Biol **21**(20): 6841-6850.
- Corvol, H., S. M. Blackman, P. Y. Boelle, P. J. Gallins, R. G. Pace, J. R. Stonebraker, F. J. Accurso, A. Clement, J. M. Collaco, H. Dang, A. T. Dang, A. Franca, J. Gong, L. Guillot, K. Keenan, W. Li, F. Lin, M. V. Patrone, K. S. Raraigh, L. Sun, Y. H. Zhou, W. K. O'Neal, M. K. Sontag, H. Levy, P. R. Durie, J. M. Rommens, M. L. Drumm, F. A. Wright, L. J. Strug, G. R. Cutting et M. R. Knowles (2015). "Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis." Nat Commun **6**: 8382.
- Corvol, H., J. Taytard, O. Tabary, P. Le Rouzic, L. Guillot et A. Clement (2015). "[Challenges of personalized medicine for cystic fibrosis]." Arch Pediatr **22**(7): 778-786.
- Crawford, I., P. C. Maloney, P. L. Zeitlin, W. B. Guggino, S. C. Hyde, H. Turley, K. C. Gatter, A. Harris et C. F. Higgins (1991). "Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 9262-9266.
- Crawford, R. R., E. T. Prescott, C. F. Sylvester, A. N. Higdon, J. Shan, M. S. Kilberg et I. N. Mungrue (2015). "Human CHAC1 Protein Degrades Glutathione, and mRNA Induction Is Regulated by the Transcription Factors ATF4 and ATF3 and a Bipartite ATF/CRE Regulatory Element." J Biol Chem **290**(25): 15878-15891.
- Cutting, G. R. (2005). "Modifier genetics: cystic fibrosis." Annu Rev Genomics Hum Genet **6**: 237-260.

- Dali, R., F. Verginelli, A. Pramatarova, R. Sladek et S. Stifani (2018). "Characterization of a FOXG1:TLE1 transcriptional network in glioblastoma-initiating cells." Mol Oncol **12**(6): 775-787.
- Day, B. J., A. M. van Heeckeren, E. Min et L. W. Velsor (2004). "Role for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein in a glutathione response to bronchopulmonary pseudomonas infection." Infect Immun **72**(4): 2045-2051.
- De Boeck, K. et M. D. Amaral (2016). "Progress in therapies for cystic fibrosis." Lancet Respir Med **4**(8): 662-674.
- De Rey Pailhade, M. J. (1888). "Sur un corps d'origine organique hydrogénant le soufre a froid " C R Acad Sci **106**: 1683-1684.
- Deng, J., P. D. Lu, Y. Zhang, D. Scheuner, R. J. Kaufman, N. Sonenberg, H. P. Harding et D. Ron (2004). "Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2." Mol Cell Biol **24**(23): 10161-10168.
- Descamps, D., M. Le Gars, V. Balloy, D. Barbier, S. Maschalidi, M. Tohme, M. Chignard, R. Ramphal, B. Manoury et J. M. Sallenave (2012). "Toll-like receptor 5 (TLR5), IL-1beta secretion, and asparagine endopeptidase are critical factors for alveolar macrophage phagocytosis and bacterial killing." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(5): 1619-1624.
- Di Sant'Agnese, P. A., R. C. Darling, G. A. Perera et E. Shea (1953). "Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease." Pediatrics **12**(5): 549-563.
- Dixon, S. J., D. N. Patel, M. Welsch, R. Skouta, E. D. Lee, M. Hayano, A. G. Thomas, C. E. Gleason, N. P. Tatonetti, B. S. Slusher et B. R. Stockwell (2014). "Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis." Elife **3**: e02523.
- Dlugosz, A., S. Muschiol, K. Zakikhany, G. Assadi, M. D'Amato et G. Lindberg (2014). "Human enteroendocrine cell responses to infection with Chlamydia trachomatis: a microarray study." Gut Pathog **6**: 24.
- Do, J. H. (2014). "Neurotoxin-induced pathway perturbation in human neuroblastoma SH-EP cells." Mol Cells **37**(9): 672-684.
- Dodge, J. A. et D. Turck (2006). "Cystic fibrosis: nutritional consequences and management." Best Pract Res Clin Gastroenterol **20**(3): 531-546.
- Doring, G. et E. Gulbins (2009). "Cystic fibrosis and innate immunity: how chloride channel mutations provoke lung disease." Cell Microbiol **11**(2): 208-216.

- Durieu, I., C. Amsellem, C. Paulin, M. T. Chambe, J. Bienvenu, G. Bellon et Y. Pacheco (1999). "Fas and Fas ligand expression in cystic fibrosis airway epithelium." Thorax **54**(12): 1093-1098.
- Eidelman, O., M. Srivastava, J. Zhang, X. Leighton, J. Murtie, C. Jozwik, K. Jacobson, D. L. Weinstein, E. L. Metcalf et H. B. Pollard (2001). "Control of the proinflammatory state in cystic fibrosis lung epithelial cells by genes from the TNF-alphaR/NFkappaB pathway." Mol Med **7**(8): 523-534.
- Elborn, J. S. (2016). "Cystic fibrosis." Lancet **388**(10059): 2519-2531.
- Ellsworth, R. E., D. C. Jamison, J. W. Touchman, S. L. Chisoe, V. V. Braden Maduro, G. G. Bouffard, N. L. Dietrich, S. M. Beckstrom-Sternberg, L. M. Iyer, L. A. Weintraub, M. Cotton, L. Courtney, J. Edwards, R. Maupin, P. Ozersky, T. Rohlfig, P. Wohldmann, T. Miner, K. Kemp, J. Kramer, I. Korf, K. Pepin, L. Antonacci-Fulton, R. S. Fulton, P. Minx, L. W. Hillier, R. K. Wilson, R. H. Waterston, W. Miller et E. D. Green (2000). "Comparative genomic sequence analysis of the human and mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(3): 1172-1177.
- Endo, M., S. Oyadomari, M. Suga, M. Mori et T. Gotoh (2005). "The ER stress pathway involving CHOP is activated in the lungs of LPS-treated mice." J Biochem **138**(4): 501-507.
- Ernst, R. K., S. M. Moskowitz, J. C. Emerson, G. M. Kraig, K. N. Adams, M. D. Harvey, B. Ramsey, D. P. Speert, J. L. Burns et S. I. Miller (2007). "Unique lipid a modifications in Pseudomonas aeruginosa isolated from the airways of patients with cystic fibrosis." J Infect Dis **196**(7): 1088-1092.
- Ernst, R. K., E. C. Yi, L. Guo, K. B. Lim, J. L. Burns, M. Hackett et S. I. Miller (1999). "Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway Pseudomonas aeruginosa." Science **286**(5444): 1561-1565.
- Esposito, V., F. Grosjean, J. Tan, L. Huang, L. Zhu, J. Chen, H. Xiong, G. E. Striker et F. Zheng (2013). "CHOP deficiency results in elevated lipopolysaccharide-induced inflammation and kidney injury." Am J Physiol Renal Physiol **304**(4): F440-450.
- Evans, M. J., R. A. Cox, S. G. Shami et C. G. Plopper (1990). "Junctional adhesion mechanisms in airway basal cells." Am J Respir Cell Mol Biol **3**(4): 341-347.
- Evans, M. J. et C. G. Plopper (1988). "The role of basal cells in adhesion of columnar epithelium to airway basement membrane." Am Rev Respir Dis **138**(2): 481-483.
- Fanconi, G. (1936). "Das Coeliakie-syndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasien." Wien Med Wchnschr.

- Fanen, P., A. Wohlhuter-Haddad et A. Hinzpeter (2014). "Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies." Int J Biochem Cell Biol **52**: 94-102.
- Farber, S. (1943). "Pancreatic insufficiency and the celiac syndrome." N Engl J Med **229**: 653-682.
- Farriaux, J. P., M. Vidailhet, M. L. Briard, V. Belot et J. L. Dhondt (2003). "Neonatal screening for cystic fibrosis: France rises to the challenge." J Inherit Metab Dis **26**(8): 729-744.
- Fischer, H., U. Koenig, L. Eckhart et E. Tschachler (2002). "Human caspase 12 has acquired deleterious mutations." Biochem Biophys Res Commun **293**(2): 722-726.
- Folkesson, A., L. Jelsbak, L. Yang, H. K. Johansen, O. Ciofu, N. Hoiby et S. Molin (2012). "Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective." Nat Rev Microbiol **10**(12): 841-851.
- Franco, R. et J. A. Cidlowski (2009). "Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant." Cell Death Differ **16**(10): 1303-1314.
- Gabriel, S. E., L. L. Clarke, R. C. Boucher et M. J. Stutts (1993). "CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship." Nature **363**(6426): 263-268.
- Galli, F., A. Battistoni, R. Gambari, A. Pompella, A. Bragonzi, F. Pilolli, L. Iuliano, M. Piroddi, M. C. Dehecchi, G. Cabrini et F. Working Group on Inflammation in Cystic (2012). "Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis." Biochim Biophys Acta **1822**(5): 690-713.
- Galluzzi, L., M. De Santi, R. Crinelli, C. De Marco, N. Zaffaroni, A. Duranti, G. Brandi et M. Magnani (2012). "Induction of endoplasmic reticulum stress response by the indole-3-carbinol cyclic tetrameric derivative CTet in human breast cancer cell lines." PLoS One **7**(8): e43249.
- Gargalovic, P. S., M. Imura, B. Zhang, N. M. Gharavi, M. J. Clark, J. Pagnon, W. P. Yang, A. He, A. Truong, S. Patel, S. F. Nelson, S. Horvath, J. A. Berliner, T. G. Kirchgessner et A. J. Lusis (2006). "Identification of inflammatory gene modules based on variations of human endothelial cell responses to oxidized lipids." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(34): 12741-12746.
- Garrett, E. S., D. Perlegas et D. J. Wozniak (1999). "Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU)." J Bacteriol **181**(23): 7401-7404.
- Garrod, A. E. et W. H. Hurley (1912). "Congenital familial steatorrhea." Q J Med **6**: 242-258.

- Gething, M. J. et J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." Nature **355**(6355): 33-45.
- Gibson (2002). Respiratory Medicine, Elsevier Science Ltd.
- Gilbert, A., M. Jadot, E. Leontieva, S. Wattiaux-De Coninck et R. Wattiaux (1998). "Delta F508 CFTR localizes in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment in cystic fibrosis cells." Exp Cell Res **242**(1): 144-152.
- Glennon, N. B., O. Jabado, M. K. Lo et M. L. Shaw (2015). "Transcriptome Profiling of the Virus-Induced Innate Immune Response in Pteropus vampyrus and Its Attenuation by Nipah Virus Interferon Antagonist Functions." J Virol **89**(15): 7550-7566.
- Glowacka, I., S. Bertram, M. A. Muller, P. Allen, E. Soilleux, S. Pfefferle, I. Steffen, T. S. Tsegaye, Y. He, K. Gnirss, D. Niemeyer, H. Schneider, C. Drosten et S. Pohlmann (2011). "Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response." J Virol **85**(9): 4122-4134.
- Goebel, G., R. Berger, A. M. Strasak, D. Egle, E. Muller-Holzner, S. Schmidt, J. Rainer, E. Presul, W. Parson, S. Lang, A. Jones, M. Widschwendter et H. Fiegl (2012). "Elevated mRNA expression of CHAC1 splicing variants is associated with poor outcome for breast and ovarian cancer patients." Br J Cancer **106**(1): 189-198.
- Gotoh, T., K. Terada, S. Oyadomari et M. Mori (2004). "hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria." Cell Death Differ **11**(4): 390-402.
- Gottlieb, R. A. et A. Dosanjh (1996). "Mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits acidification and apoptosis in C127 cells: possible relevance to cystic fibrosis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(8): 3587-3591.
- Griese, M., J. Ramakers, A. Krasselt, V. Starosta, S. Van Koningsbruggen, R. Fischer, F. Ratjen, B. Mullinger, R. M. Huber, K. Maier, E. Rietschel et G. Scheuch (2004). "Improvement of alveolar glutathione and lung function but not oxidative state in cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **169**(7): 822-828.
- Grootjans, J., A. Kaser, R. J. Kaufman et R. S. Blumberg (2016). "The unfolded protein response in immunity and inflammation." Nat Rev Immunol **16**(8): 469-484.
- Gurczynski, S. J., S. Das et P. E. Pellett (2014). "Deletion of the human cytomegalovirus US17 gene increases the ratio of genomes per infectious unit and alters regulation of immune and endoplasmic reticulum stress response genes at early and late times after infection." J Virol **88**(4): 2168-2182.

- Haardt, M., M. Benharouga, D. Lechardeur, N. Kartner et G. L. Lukacs (1999). "C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation." J Biol Chem **274**(31): 21873-21877.
- Haddad, J. J., B. Safieh-Garabedian, N. E. Saade et R. Lauterbach (2002). "Inhibition of glutathione-related enzymes augments LPS-mediated cytokine biosynthesis: involvement of an I κ B/NF- κ B-sensitive pathway in the alveolar epithelium." Int Immunopharmacol **2**(11): 1567-1583.
- Han, J., S. H. Back, J. Hur, Y. H. Lin, R. Gildersleeve, J. Shan, C. L. Yuan, D. Krokowski, S. Wang, M. Hatzoglou, M. S. Kilberg, M. A. Sartor et R. J. Kaufman (2013). "ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death." Nat Cell Biol **15**(5): 481-490.
- Harding, H. P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira et D. Ron (2000). "Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells." Mol Cell **6**(5): 1099-1108.
- Harington, C. R. et T. H. Mead (1935). "Synthesis of glutathione." Biochem J **29**: 1602-1611.
- Hattori, T., S. Itoh, H. Hayashi, T. Chiba, T. Takii, K. Yoshizaki et K. Onozaki (2001). "CHOP, a basic leucine zipper transcriptional factor, contributes to the antiproliferative effect of IL-1 on A375 human melanoma cells through augmenting transcription of IL-6." J Interferon Cytokine Res **21**(5): 323-332.
- Hattori, T., N. Ohoka, H. Hayashi et K. Onozaki (2003). "C/EBP homologous protein (CHOP) up-regulates IL-6 transcription by trapping negative regulating NF-IL6 isoform." FEBS Lett **541**(1-3): 33-39.
- Henson, P. M. et R. M. Tuder (2008). "Apoptosis in the lung: induction, clearance and detection." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **294**(4): L601-611.
- Hetz, C. (2012). "The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(2): 89-102.
- Hopfe, M., R. Deenen, D. Degrandi, K. Kohrer et B. Henrich (2013). "Host cell responses to persistent mycoplasmas--different stages in infection of HeLa cells with Mycoplasma hominis." PLoS One **8**(1): e54219.
- Hopkins, F. G. (1929). "On glutathione: a reinvestigation." J Biol Chem **84**: 269-320.
- Hu, P., Z. Han, A. D. Couvillon, R. J. Kaufman et J. H. Exton (2006). "Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor

pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression." Mol Cell Biol **26**(8): 3071-3084.

Hueck, C. J. (1998). "Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 379-433.

Hybiske, K., Z. Fu, C. Schwarzer, J. Tseng, J. Do, N. Huang et T. E. Machen (2007). "Effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and DeltaF508CFTR on inflammatory response, ER stress, and Ca²⁺ of airway epithelia." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(5): L1250-1260.

Iwasaki, Y., T. Suganami, R. Hachiya, I. Shirakawa, M. Kim-Saijo, M. Tanaka, M. Hamaguchi, T. Takai-Igarashi, M. Nakai, Y. Miyamoto et Y. Ogawa (2014). "Activating transcription factor 4 links metabolic stress to interleukin-6 expression in macrophages." Diabetes **63**(1): 152-161.

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

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

Jahn, B., M. Arvandi, U. Rochau, H. Fiegl, G. Goebel, C. Marth et U. Siebert (2017). "Development of a novel prognostic score for breast cancer patients using mRNA expression of CHAC1." J Comp Eff Res **6**(7): 563-574.

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

Jiang, F., X. Wang, B. Wang, L. Chen, Z. Zhao, N. R. Waterfield, G. Yang et Q. Jin (2016). "The *Pseudomonas aeruginosa* Type VI Secretion PGAP1-like Effector Induces Host Autophagy by Activating Endoplasmic Reticulum Stress." Cell Rep **16**(6): 1502-1509.

Joo, J. H., E. Ueda, C. D. Bortner, X. P. Yang, G. Liao et A. M. Jetten (2015). "Farnesol activates the intrinsic pathway of apoptosis and the ATF4-ATF3-CHOP cascade of ER stress in human T lymphoblastic leukemia Molt4 cells." Biochem Pharmacol **97**(3): 256-268.

Joo, N. E., K. Ritchie, P. Kamarajan, D. Miao et Y. L. Kapila (2012). "Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC1." Cancer Med **1**(3): 295-305.

Kassim, S. Y., S. A. Gharib, B. H. Mecham, T. P. Birkland, W. C. Parks et J. K. McGuire (2007). "Individual matrix metalloproteinases control distinct transcriptional responses in

airway epithelial cells infected with *Pseudomonas aeruginosa*." Infect Immun **75**(12): 5640-5650.

Kaur, A., R. Gautam, R. Srivastava, A. Chandel, A. Kumar, S. Karthikeyan et A. K. Bachhawat (2017). "ChaC2, an Enzyme for Slow Turnover of Cytosolic Glutathione." J Biol Chem **292**(2): 638-651.

Kerbiriou, M., M. A. Le Drevo, C. Ferec et P. Trouve (2007). "Coupling cystic fibrosis to endoplasmic reticulum stress: Differential role of Grp78 and ATF6." Biochim Biophys Acta **1772**(11-12): 1236-1249.

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

Kerem, E. et B. Kerem (1995). "The relationship between genotype and phenotype in cystic fibrosis." Curr Opin Pulm Med **1**(6): 450-456.

Khan, T. Z., J. S. Wagener, T. Bost, J. Martinez, F. J. Accurso et D. W. Riches (1995). "Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **151**(4): 1075-1082.

Kimura, K. et R. C. Huang (2016). "Tetra-O-Methyl Nordihydroguaiaretic Acid Broadly Suppresses Cancer Metabolism and Synergistically Induces Strong Anticancer Activity in Combination with Etoposide, Rapamycin and UCN-01." PLoS One **11**(2): e0148685.

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

Knowles, M. R., J. T. Gatzky et R. C. Boucher (1981). "Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis." N Eng J Med **305**: 1489-1495.

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

Konstan, M. W., K. A. Hilliard, T. M. Norvell et M. Berger (1994). "Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation." Am J Respir Crit Care Med **150**(2): 448-454.

Kozutsumi, Y., M. Segal, K. Normington, M. J. Gething et J. Sambrook (1988). "The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins." Nature **332**(6163): 462-464.

- Kreda, S. M., M. Mall, A. Mengos, L. Rochelle, J. Yankaskas, J. R. Riordan et R. C. Boucher (2005). "Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia." Mol Biol Cell **16**(5): 2154-2167.
- Kumar, A., S. Tikoo, S. Maity, S. Sengupta, S. Sengupta, A. Kaur et A. K. Bachhawat (2012). "Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as gamma-glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione." EMBO Rep **13**(12): 1095-1101.
- Landsteiner, K. (1905). "Darmverschluss durch eingedicktes Meconium. Pankreatitis." Zentrabl Allg Pathol **16**: 903-907.
- Li, S., L. Guo, P. Qian, Y. Zhao, A. Liu, F. Ji, L. Chen, X. Wu et G. Qian (2015). "Lipopolysaccharide Induces Autophagic Cell Death through the PERK-Dependent Branch of the Unfolded Protein Response in Human Alveolar Epithelial A549 Cells." Cell Physiol Biochem **36**(6): 2403-2417.
- Linsdell, P. et J. W. Hanrahan (1998). "Glutathione permeability of CFTR." Am J Physiol **275**(1 Pt 1): C323-326.
- Linsdell, P., J. A. Tabcharani, J. M. Rommens, Y. X. Hou, X. B. Chang, L. C. Tsui, J. R. Riordan et J. W. Hanrahan (1997). "Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions." J Gen Physiol **110**(4): 355-364.
- Liu, F., Z. Zhang, L. Csanady, D. C. Gadsby et J. Chen (2017). "Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel." Cell **169**(1): 85-95 e88.
- Liu, Y., A. S. Hyde, M. A. Simpson et J. J. Barycki (2014). "Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism." Adv Cancer Res **122**: 69-101.
- Lopes-Pacheco, M. (2016). "CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis." Front Pharmacol **7**: 275.
- Losa, D., T. Kohler, J. Bellec, T. Dudev, S. Crespín, M. Bacchetta, P. Boulanger, S. S. Hong, S. Morel, T. H. Nguyen, C. van Delden et M. Chanson (2014). "Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis in airway epithelial cells is mediated by gap junctional communication in a JNK-dependent manner." J Immunol **192**(10): 4804-4812.
- Lu, S. C. (2009). "Regulation of glutathione synthesis." Mol Aspects Med **30**(1-2): 42-59.
- Luciani, A., V. R. Vilella, S. Esposito, N. Brunetti-Pierri, D. Medina, C. Settembre, M. Gavina, L. Pulze, I. Giardino, M. Pettoello-Mantovani, M. D'Apolito, S. Guido, E. Masliah, B. Spencer, S. Quarantino, V. Raia, A. Ballabio et L. Maiuri (2010). "Defective CFTR induces

- aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition." Nat Cell Biol **12**(9): 863-875.
- Magne, L., E. Blanc, B. Legrand, D. Lucas, R. Barouki, H. Rouach et M. Garlatti (2011). "ATF4 and the integrated stress response are induced by ethanol and cytochrome P450 2E1 in human hepatocytes." J Hepatol **54**(4): 729-737.
- Maiuri, L., V. Raia, G. De Marco, S. Coletta, G. de Ritis, M. Londei et S. Auricchio (1997). "DNA fragmentation is a feature of cystic fibrosis epithelial cells: a disease with inappropriate apoptosis?" FEBS Lett **408**(2): 225-231.
- Mall, M., M. Bleich, R. Greger, R. Schreiber et K. Kunzelmann (1998). "The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways." J Clin Invest **102**(1): 15-21.
- Marcinak, S. J. et D. Ron (2010). "The unfolded protein response in lung disease." Proc Am Thorac Soc **7**(6): 356-362.
- Marciniak, S. J., C. Y. Yun, S. Oyadomari, I. Novoa, Y. Zhang, R. Jungreis, K. Nagata, H. P. Harding et D. Ron (2004). "CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum." Genes Dev **18**(24): 3066-3077.
- Martin, T. R., N. Hagimoto, M. Nakamura et G. Matute-Bello (2005). "Apoptosis and epithelial injury in the lungs." Proc Am Thorac Soc **2**(3): 214-220.
- Martinson, F., X. Chen, A. H. Lee et L. H. Glimcher (2010). "TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages." Nat Immunol **11**(5): 411-418.
- Maselli, J. H., M. K. Sontag, J. M. Norris, T. MacKenzie, J. S. Wagener et F. J. Accurso (2003). "Risk factors for initial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis identified by newborn screening." Pediatr Pulmonol **35**(4): 257-262.
- Matsui, H., B. R. Grubb, R. Tarran, S. H. Randell, J. T. Gatzky, C. W. Davis et R. C. Boucher (1998). "Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease." Cell **95**(7): 1005-1015.
- Mazzio, E. A., C. A. Lewis et K. F. A. Soliman (2017). "Transcriptomic Profiling of MDA-MB-231 Cells Exposed to *Boswellia Serrata* and 3-O-Acetyl-B-Boswellic Acid; ER/UPR Mediated Programmed Cell Death." Cancer Genomics Proteomics **14**(6): 409-425.
- McCullough, K. D., J. L. Martindale, L. O. Klotz, T. Y. Aw et N. J. Holbrook (2001). "Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state." Mol Cell Biol **21**(4): 1249-1259.

- Melo, E. P., C. Lopes, P. Gollwitzer, S. Lortz, S. Lenzen, I. Mehmeti, C. F. Kaminski, D. Ron et E. Avezov (2017). "TriPer, an optical probe tuned to the endoplasmic reticulum tracks changes in luminal H₂O₂." BMC Biol **15**(1): 24.
- Mlera, L., J. Lam, D. K. Offerdahl, C. Martens, D. Sturdevant, C. V. Turner, S. F. Porcella et M. E. Bloom (2016). "Transcriptome Analysis Reveals a Signature Profile for Tick-Borne Flavivirus Persistence in HEK 293T Cells." MBio **7**(3).
- Moran, R. (1988). Visual Histology. Philadelphia.
- Morishima, N., K. Nakanishi, H. Takenouchi, T. Shibata et Y. Yasuhiko (2002). "An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12." J Biol Chem **277**(37): 34287-34294.
- Muhlebach, M. S., P. W. Stewart, M. W. Leigh et T. L. Noah (1999). "Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients." Am J Respir Crit Care Med **160**(1): 186-191.
- Munck, A. et M. Roussey (2008). "[The French nationwide cystic fibrosis newborn screening program: strategy and results]." Arch Pediatr **15 Suppl 1**: S1-6.
- Mungrue, I. N., J. Pagnon, O. Kohannim, P. S. Gargalovic et A. J. Lusis (2009). "CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade." J Immunol **182**(1): 466-476.
- Mungrue, I. N., E. T. Prescott, C. F. Sylvester et R. R. Crawford (2015). "Abstract 324: Knockout of the Pro-apoptotic Er-stress Gene Chac1 in Mice Results in Embryonic Lethality and Activation of the Notch Pathway." Circulation Research **117**: A324-A324.
- Nanua, S., U. Sajjan, S. Keshavjee et M. B. Hershenson (2006). "Absence of typical unfolded protein response in primary cultured cystic fibrosis airway epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **343**(1): 135-143.
- Nomura, Y., Y. Hirata, K. Kiuchi et K. Oh-Hashi (2016). "Translational and post-translational regulation of mouse cation transport regulator homolog 1." Sci Rep **6**: 28016.
- O'Sullivan, B. P. et S. D. Freedman (2009). "Cystic fibrosis." Lancet **373**(9678): 1891-1904.
- O'Toole, G. A. et R. Kolter (1998). "Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development." Mol Microbiol **30**(2): 295-304.
- Oh-Hashi, K., Y. Nomura, K. Shimada, H. Koga, Y. Hirata et K. Kiuchi (2013). "Transcriptional and post-translational regulation of mouse cation transport regulator homolog 1." Mol Cell Biochem **380**(1-2): 97-106.

- Ooi, C. Y. et P. R. Durie (2016). "Cystic fibrosis from the gastroenterologist's perspective." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **13**(3): 175-185.
- Ord, D., T. Ord, T. Biene et T. Ord (2016). "TRIB3 increases cell resistance to arsenite toxicity by limiting the expression of the glutathione-degrading enzyme CHAC1." Biochim Biophys Acta **1863**(11): 2668-2680.
- Orlowski, M. et A. Meister (1970). "The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids." Proc Natl Acad Sci U S A **67**(3): 1248-1255.
- Pedersen, S. S., N. Hoiby, F. Espersen et C. Koch (1992). "Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis." Thorax **47**(1): 6-13.
- Pier, G. B. (2000). "Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 8822-8828.
- Poppe, M., S. Wittig, L. Jurida, M. Bartkuhn, J. Wilhelm, H. Muller, K. Beuerlein, N. Karl, S. Bhujji, J. Ziebuhr, M. L. Schmitz et M. Kracht (2017). "The NF-kappaB-dependent and -independent transcriptome and chromatin landscapes of human coronavirus 229E-infected cells." PLoS Pathog **13**(3): e1006286.
- Qiu, S., P. Y. Liu et T. Liu (2017). "Up-regulation of LYAR blocks Myc-induced cell death." Cell Cycle **16**(20): 1857-1858.
- Rajan, S., G. Cacalano, R. Bryan, A. J. Ratner, C. U. Sontich, A. van Heerckeren, P. Davis et A. Prince (2000). "Pseudomonas aeruginosa induction of apoptosis in respiratory epithelial cells: analysis of the effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction and bacterial virulence factors." Am J Respir Cell Mol Biol **23**(3): 304-312.
- Raoust, E., V. Balloy, I. Garcia-Verdugo, L. Touqui, R. Ramphal et M. Chignard (2009). "Pseudomonas aeruginosa LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells." PLoS One **4**(10): e7259.
- Ribeiro, C. M. et R. C. Boucher (2010). "Role of endoplasmic reticulum stress in cystic fibrosis-related airway inflammatory responses." Proc Am Thorac Soc **7**(6): 387-394.
- Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou et et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." Science **245**(4922): 1066-1073.
- Rochholz, E. L. (1857). "Alemannisches Kinderlied und Kinderspiel aus der SchweizGesammelt."

- Rolfe, A. J., D. B. Bosco, J. Wang, R. S. Nowakowski, J. Fan et Y. Ren (2016). "Bioinformatic analysis reveals the expression of unique transcriptomic signatures in Zika virus infected human neural stem cells." Cell Biosci **6**: 42.
- Romanoski, C. E., N. Che, F. Yin, N. Mai, D. Pouldar, M. Civelek, C. Pan, S. Lee, L. Vakili, W. P. Yang, P. Kayne, I. N. Mungrue, J. A. Araujo, J. A. Berliner et A. J. Lusis (2011). "Network for activation of human endothelial cells by oxidized phospholipids: a critical role of heme oxygenase 1." Circ Res **109**(5): e27-41.
- Rommens, J. M., M. C. Iannuzzi, B. Kerem, M. L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J. L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka et et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping." Science **245**(4922): 1059-1065.
- Ross, P. (2006). Histology. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins.
- Rottner, M., C. Kunzelmann, M. Mergey, J. M. Freyssinet et M. C. Martinez (2007). "Exaggerated apoptosis and NF-kappaB activation in pancreatic and tracheal cystic fibrosis cells." FASEB J **21**(11): 2939-2948.
- Roum, J. H., R. Buhl, N. G. McElvaney, Z. Borok et R. G. Crystal (1993). "Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis." J Appl Physiol (1985) **75**(6): 2419-2424.
- Rowntree, R. K. et A. Harris (2003). "The phenotypic consequences of CFTR mutations." Ann Hum Genet **67**(Pt 5): 471-485.
- Sadikot, R. T., T. S. Blackwell, J. W. Christman et A. S. Prince (2005). "Pathogen-host interactions in Pseudomonas aeruginosa pneumonia." Am J Respir Crit Care Med **171**(11): 1209-1223.
- Sagel, S. D., J. F. Chmiel et M. W. Konstan (2007). "Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease." Proc Am Thorac Soc **4**(4): 406-417.
- Saint-Criq, V., B. Villeret, F. Bastaert, S. Kheir, A. Hatton, A. Cazes, Z. Xing, I. Sermet-Gaudelus, I. Garcia-Verdugo, A. Edelman et J. M. Sallenave (2018). "Pseudomonas aeruginosa LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator-IL-6-antimicrobial-repair pathway." Thorax **73**(1): 49-61.
- Schiller, K. R., P. J. Maniak et S. M. O'Grady (2010). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair." Am J Physiol Cell Physiol **299**(5): C912-921.
- Scriven, P., N. J. Brown, A. G. Pockley et L. Wyld (2007). "The unfolded protein response and cancer: a brighter future unfolding?" J Mol Med (Berl) **85**(4): 331-341.

- Scriven, P., S. Coulson, R. Haines, S. Balasubramanian, S. Cross et L. Wyld (2009). "Activation and clinical significance of the unfolded protein response in breast cancer." Br J Cancer **101**(10): 1692-1698.
- Selvik, L. K., C. S. Fjeldbo, A. Flatberg, T. S. Steigedal, K. Misund, E. Anderssen, B. Doseeth, M. Langaas, S. Tripathi, V. Beisvag, A. Laegreid, L. Thommesen et T. Bruland (2013). "The duration of gastrin treatment affects global gene expression and molecular responses involved in ER stress and anti-apoptosis." BMC Genomics **14**: 429.
- Sermet-Gaudelus, I., A. Munck, M. Rota, M. Roussey, D. Feldmann, T. Nguyen-Khoa et m. Groupe de travail "Depistage neonatal" de la Federation des centres de ressources et de competences de la (2010). "[French guidelines for sweat test practice and interpretation for cystic fibrosis neonatal screening]." Arch Pediatr **17**(9): 1349-1358.
- Sheng, L., L. Wang, X. Sang, X. Zhao, J. Hong, S. Cheng, X. Yu, D. Liu, B. Xu, R. Hu, Q. Sun, J. Cheng, Z. Cheng, S. Gui et F. Hong (2014). "Nano-sized titanium dioxide-induced splenic toxicity: a biological pathway explored using microarray technology." J Hazard Mater **278**: 180-188.
- Sheppard, D. N. et M. J. Welsh (1999). "Structure and function of the CFTR chloride channel." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S23-45.
- Shkoda, A., P. A. Ruiz, H. Daniel, S. C. Kim, G. Rogler, R. B. Sartor et D. Haller (2007). "Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation." Gastroenterology **132**(1): 190-207.
- Singh, G. et S. L. Katyal (1997). "Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10)." Am J Respir Cell Mol Biol **17**(2): 141-143.
- Sleigh, M. A., J. R. Blake et N. Liron (1988). "The propulsion of mucus by cilia." Am Rev Respir Dis **137**(3): 726-741.
- Smith, J. A. (2018). "Regulation of Cytokine Production by the Unfolded Protein Response; Implications for Infection and Autoimmunity." Front Immunol **9**: 422.
- Soleti, R., C. Porro et M. C. Martinez (2013). "Apoptotic process in cystic fibrosis cells." Apoptosis **18**(9): 1029-1038.
- Spina, D. (1998). "Epithelium smooth muscle regulation and interactions." Am J Respir Crit Care Med **158**(5 Pt 3): S141-145.
- Stelzer, Y., O. Yanuka et N. Benvenisty (2011). "Global analysis of parental imprinting in human parthenogenetic induced pluripotent stem cells." Nat Struct Mol Biol **18**(6): 735-741.

- Stephenson, A. L., S. Stanojevic, J. Sykes et P. R. Burgel (2017). "The changing epidemiology and demography of cystic fibrosis." Presse Med **46**(6 Pt 2): e87-e95.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory et M. V. Olson (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen." Nature **406**(6799): 959-964.
- Sun, Y., B. Atmadibrata, D. Yu, M. Wong, B. Liu, N. Ho, D. Ling, A. E. Tee, J. Wang, I. N. Mungrue, P. Y. Liu et T. Liu (2017). "Upregulation of LYAR induces neuroblastoma cell proliferation and survival." Cell Death Differ **24**(9): 1645-1654.
- Suntres, Z. E., A. Omri et P. N. Shek (2002). "Pseudomonas aeruginosa-induced lung injury: role of oxidative stress." Microb Pathog **32**(1): 27-34.
- Tang, A. C., A. Saferali, G. He, A. J. Sandford, L. J. Strug et S. E. Turvey (2017). "Endoplasmic Reticulum Stress and Chemokine Production in Cystic Fibrosis Airway Cells: Regulation by STAT3 Modulation." J Infect Dis **215**(2): 293-302.
- Tang, C., D. Lan, H. Zhang, J. Ma et H. Yue (2013). "Transcriptome analysis of duck liver and identification of differentially expressed transcripts in response to duck hepatitis A virus genotype C infection." PLoS One **8**(7): e71051.
- Tirouvanziam, R., S. de Bentzmann, C. Hubeau, J. Hinnrasky, J. Jacquot, B. Peault et E. Puchelle (2000). "Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts." Am J Respir Cell Mol Biol **23**(2): 121-127.
- Travers, K. J., C. K. Patil, L. Wodicka, D. J. Lockhart, J. S. Weissman et P. Walter (2000). "Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation." Cell **101**(3): 249-258.
- Tsunoda, S., E. Avezov, A. Zyryanova, T. Konno, L. Mendes-Silva, E. Pinho Melo, H. P. Harding et D. Ron (2014). "Intact protein folding in the glutathione-depleted endoplasmic reticulum implicates alternative protein thiol reductants." Elife **3**: e03421.
- van 't Wout, E. F., A. van Schadewijk, R. van Boxtel, L. E. Dalton, H. J. Clarke, J. Tommassen, S. J. Marciniak et P. S. Hiemstra (2015). "Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* Induce Both the Unfolded Protein and Integrated Stress Responses in Airway Epithelial Cells." PLoS Pathog **11**(6): e1004946.
- Vanscoy, L. L., S. M. Blackman, J. M. Collaco, A. Bowers, T. Lai, K. Naughton, M. Algire, R. McWilliams, S. Beck, J. Hoover-Fong, A. Hamosh, D. Cutler et G. R. Cutting (2007).

- "Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **175**(10): 1036-1043.
- Veit, G., R. G. Avramescu, A. N. Chiang, S. A. Houck, Z. Cai, K. W. Peters, J. S. Hong, H. B. Pollard, W. B. Guggino, W. E. Balch, W. R. Skach, G. R. Cutting, R. A. Frizzell, D. N. Sheppard, D. M. Cyr, E. J. Sorscher, J. L. Brodsky et G. L. Lukacs (2016). "From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations." Mol Biol Cell **27**(3): 424-433.
- Wada, Y., K. Takemura, P. Tummala, K. Uchida, K. Kitagaki, A. Furukawa, Y. Ishige, T. Ito, Y. Hara, T. Suzuki, H. Mimuro, P. G. Board et Y. Eishi (2018). "Helicobacter pylori induces somatic mutations in TP53 via overexpression of CHAC1 in infected gastric epithelial cells." FEBS Open Bio **8**(4): 671-679.
- Wagner, V. E. et B. H. Iglewski (2008). "P. aeruginosa Biofilms in CF Infection." Clin Rev Allergy Immunol **35**(3): 124-134.
- Wainwright, C. E., J. S. Elborn et B. W. Ramsey (2015). "Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR." N Engl J Med **373**(18): 1783-1784.
- Wang, C. K., S. C. Yang, S. C. Hsu, F. P. Chang, Y. T. Lin, S. F. Chen, C. L. Cheng, M. Hsiao, F. L. Lu et J. Lu (2017). "CHAC2 is essential for self-renewal and glutathione maintenance in human embryonic stem cells." Free Radic Biol Med **113**: 439-451.
- Welsh, M. J., B. W. Ramsey, F. Accurso et G. R. Cutting (2001). "Cystic Fibrosis." New York: McGraw-Hill **8th ed.**
- Welsh, M. J. et A. E. Smith (1993). "Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis." Cell **73**(7): 1251-1254.
- Wilschanski, M. et P. R. Durie (2007). "Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene." Gut **56**(8): 1153-1163.
- Winkelmann, A. et T. Noack (2010). "The Clara cell: a "Third Reich eponym"?" Eur Respir J **36**(4): 722-727.
- Woo, C. W., D. Cui, J. Arellano, B. Dorweiler, H. Harding, K. A. Fitzgerald, D. Ron et I. Tabas (2009). "Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling." Nat Cell Biol **11**(12): 1473-1480.
- Wu, G., Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton et N. D. Turner (2004). "Glutathione metabolism and its implications for health." J Nutr **134**(3): 489-492.

- Yalcin, E., B. Talim, U. Ozcelik, D. Dogru, N. Cobanoglu, S. Pekcan et N. Kiper (2009). "Does defective apoptosis play a role in cystic fibrosis lung disease?" Arch Med Res **40**(7): 561-564.
- Yamazaki, H., N. Hiramatsu, K. Hayakawa, Y. Tagawa, M. Okamura, R. Ogata, T. Huang, S. Nakajima, J. Yao, A. W. Paton, J. C. Paton et M. Kitamura (2009). "Activation of the Akt-NF-kappaB pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response." J Immunol **183**(2): 1480-1487.
- Yang, Z. S., L. Q. Ma, K. Zhu, J. Y. Yan, L. Bian, K. Q. Zhang et C. G. Zou (2016). "Pseudomonas toxin pyocyanin triggers autophagy: Implications for pathoadaptive mutations." Autophagy **12**(6): 1015-1028.
- Yasuda, M., Y. Tanaka, M. Ryu, S. Tsuda et T. Nakazawa (2014). "RNA sequence reveals mouse retinal transcriptome changes early after axonal injury." PLoS One **9**(3): e93258.
- Yu, H., Y. H. Zeidan, B. X. Wu, R. W. Jenkins, T. R. Flotte, Y. A. Hannun et I. Virella-Lowell (2009). "Defective acid sphingomyelinase pathway with Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis." Am J Respir Cell Mol Biol **41**(3): 367-375.
- Yu, S., G. Wang, J. Liao, M. Tang et W. Sun (2018). "Transcriptome Profile Analysis of Mechanisms of Black and White Plumage Determination in Black-Bone Chicken." Cell Physiol Biochem **46**(6): 2373-2384.
- Zhang, C., N. Bai, A. Chang, Z. Zhang, J. Yin, W. Shen, Y. Tian, R. Xiang et C. Liu (2013). "ATF4 is directly recruited by TLR4 signaling and positively regulates TLR4-triggered cytokine production in human monocytes." Cell Mol Immunol **10**(1): 84-94.
- Zhang, W., H. Li, G. Cheng, S. Hu, Z. Li et D. Bi (2008). "Avian influenza virus infection induces differential expression of genes in chicken kidney." Res Vet Sci **84**(3): 374-381.
- Zhou, Y., T. M. Bennett et A. Shiels (2016). "Lens ER-stress response during cataract development in Mip-mutant mice." Biochim Biophys Acta **1862**(8): 1433-1442.

Annexe



Bronchial Epithelial Cells from Cystic Fibrosis Patients Express a Specific Long Non-coding RNA Signature upon *Pseudomonas aeruginosa* Infection

Viviane Balloy¹, Remya Koshy², Lea Perra¹, Harriet Corvol^{1,3}, Michel Chignard¹, Loïc Guillot^{1*†} and Vinod Scaria^{2,4*†}

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris, France, ²GN Ramachandran Knowledge Center for Genome Informatics, CSIR Institute of Genomics and Integrative Biology, Delhi, India, ³Pneumologie Pédiatrique, AP-HP, Hôpital Trousseau, Paris, France, ⁴CSIR Institute of Genomics and Integrative Biology, Academy of Scientific and Innovative Research, Delhi, India

Pseudomonas aeruginosa (*Pa*) is the leading cause of chronic lung infection in Cystic Fibrosis (CF) patients. It is well recognized that CF epithelial cells fail to develop an appropriate response to infection, allowing bacterial colonization and a chronic inflammatory response. Since long non-coding RNAs (lncRNAs), are known to play a key role in regulating mammalian innate immune response, we hypothesized that CF cells exposed to *Pa* could express a specific lncRNA signature responsible of the maladaptative CF response. We analyzed transcriptomic datasets to compare the expression profiles of lncRNAs in primary CF and non-CF epithelial cells infected with *Pa* at 0, 2, 4, and 6 h of infection. Our analysis identified temporal expression signatures of 25, 73, 15, and 26 lncRNA transcripts differentially expressed at 0, 2, 4, and 6 h post-infection respectively, between CF and non-CF cells. In addition, we identified profiles specific to CF and non-CF cells. The differential expression of two candidate lncRNAs were independently validated using real-time PCR. We identified a specific CF signature of lncRNA expression in a context of *Pa* infection that could potentially play a role in the maladaptive immune response of CF patients.

Keywords: cystic fibrosis, lung, epithelium, *Pseudomonas aeruginosa*, lncRNA

OPEN ACCESS

Edited by:

Silvia Mercedes Uriarte,
University of Louisville, United States

Reviewed by:

Gregory Anderson,
Indiana University – Purdue University
Indianapolis, United States
Gill Diamond,
University of Florida, United States

*Correspondence:

Loïc Guillot
loic.guillot@inserm.fr
Vinod Scaria
vinods@igib.in

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Received: 02 February 2017

Accepted: 11 May 2017

Published: 29 May 2017

Citation:

Balloy V, Koshy R, Perra L, Corvol H, Chignard M, Guillot L and Scaria V (2017) Bronchial Epithelial Cells from Cystic Fibrosis Patients Express a Specific Long Non-coding RNA Signature upon *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:218. doi: 10.3389/fcimb.2017.00218

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive genetic disorder affecting one in 3,500 live births, in Caucasian populations. This disease is due to mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene encoding the transporter channel for chloride and bicarbonate ions in epithelial cells. In airways, a deficient *CFTR* results in excessive secretion of abnormally thick and viscous mucus with impairment of innate immune host defenses. This results in chronic infection and inflammation, which together acts to further deteriorate the lung function (Palmer and Whiteley, 2015). *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) is the leading cause of chronic lung infections and is responsible for significant morbidity and mortality in CF patients. Chronic *Pa* infection is characterized by repeated episodes of pulmonary exacerbations, during which lung function declines abruptly (Elborn, 2016).

Innate immunity system provides immediate defense against microbial invasion by recruiting immune cells and driving inflammation signals to sites of infection. Response of pulmonary epithelial cells to external stimuli requires tight regulation of genes involved in the innate immune response. This fine-tuned regulation, at the transcriptional and post-transcriptional levels, is necessary to prevent detrimental effects of uncontrolled cell activation. In a previous study, we compared transcriptomes of CF and non-CF bronchial epithelial cells during *Pa* infection (Balloy et al., 2015). We observed different profiles with genes up- and down-regulated in CF compared to non-CF cells that could illuminate the inflammatory response or be involved in the fighting of pathogens as well as in the decreased protection of tissue integrity.

Non-coding RNAs (ncRNAs) have recently emerged as important regulators of gene expression. Long ncRNAs (lncRNAs) larger than 200 nucleotides, represent the largest class of the ncRNA molecules. Although the current strongest evidence supports their role in cancer (Tsai et al., 2011), lncRNAs play key roles in regulating mammalian innate immune responses as well (Sigdel et al., 2015). Depending on their localization, they act on gene expression through interactions with DNA, RNA or proteins (Rinn and Chang, 2012) through various mechanisms including chromatin remodeling, epigenetic regulation, transcription, mRNA splicing, RNA decay and enhancer functions (Li et al., 2016).

It has been previously shown that lncRNA expression profile is altered in inflammatory lung diseases such as chronic obstructive pulmonary diseases (COPD), asthma and acute lung injury (ALI) (Xie and Liu, 2015). In CF, the description and the role of lncRNAs is beginning to be unraveled. However, *CFTR* expression and chloride ion function was recently shown to be regulated by lncRNA (McKiernan et al., 2014). A total of 1,063 lncRNAs with differential expression were identified from CF bronchial brush sampling compared to non-CF (Saayman et al., 2016). In particular, XIST and TLR8-AS1 were confirmed to be respectively up- and down-regulated in CF compared to non-CF samples. However, in this study, the influence of infection was not addressed, although there are increased evidences of lncRNA involvement in infectious diseases (Scaria and Pasha, 2012). Reports have revealed roles for lncRNAs as regulators of antimicrobial functions such as the lncRNA NEAT1 which directly regulates HIV replication (Zhang et al., 2013) or the lncRNA NRAV that functions as a negative regulator of the host antiviral immunity by repressing the expression of IFN-stimulated genes through strict control of the transcription rate (Ouyang et al., 2014).

We therefore investigated the differential expression of lncRNAs in CF and non-CF epithelial cells during infection by *Pa* that may partly mimic and possibly explain the differential mRNA profiles between the two cell types observed previously (Balloy et al., 2015). In the present study, we re-analyzed the RNA-seq data with this perspective and evaluated the expression profiles of lncRNAs in infected CF and non-CF epithelial cells at the aim of identifying a specific CF signature for lncRNA expression in the presence of *Pa* infection.

METHODS

Dataset

Raw datasets publicly available (European Nucleotide Archive (ENA), primary accession number PRJEB9292) were from a transcriptional analysis designed to compare the molecular determinants of CF and non-CF epithelial cells to *Pa* infection. The PAK strain of *Pa* (given by Stephen Lowry) is relevant for pulmonary infections in the context of CF. Like most of clinical strains responsible for CF infection, it expresses a full complement of virulence factors, including pili, flagella, type II secreted enzymes, type III secreted exo-enzymes S, T, and Y, exotoxin A, elastase and phospholipase. The data were generated from human bronchial epithelial cells from four CF patients homozygous for the p.F508del mutation and four healthy donors (non-CF), each infected with *Pa* at 0.25 Multiplicity of Infection (MOI) for 0, 2, 4, and 6 h. The data with an average of over 150 million reads with each data set were previously published (Balloy et al., 2015).

Reads Alignment, Mapping, and Assembly

Read quality was checked with FastQC program, a quality control tool for high throughput sequence data (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) and reads were further aligned to the hg38 build of the human genome (UCSC Genome Browser). The splice-aware aligner Tophat (Mortazavi et al., 2008) (v2.0.11) which is integrated with Bowtie2, a fast and sensitive gapped read aligner, was used for aligning the sequence reads. One dataset was excluded from further analysis after observing only less than 85% of read alignment. Datasets, raw reads and the proportion of aligned reads are summarized in Supplementary Table 1. The expression levels across the transcripts and genes were based on GENCODE v23 (<http://www.GENCODEgenes.org/>). Briefly, this annotation set comprised of a total of 198,619 transcripts in the human genome, including 79,795 protein-coding and 118,824 non-coding transcripts, among which 27,817 lncRNAs. The expression levels were computed as fragments per kilobase of exon per million (FPKM) units and the differential expression between the different sets were computed using *cuffdiff*.

Identifying Potential Differentially Expressed lncRNA Transcripts

We used a nominal cutoff of 1 FPKM to filter genes and transcripts. The Supplementary Table 2 lists out the number of genes and transcripts covered by each sample within the range of FPKM ≥ 1 , 5, and 10. The differentially expressed genes and transcripts were filtered using stringent cutoffs. We considered lncRNAs with FPKM ≥ 1 with a log₂-fold change ≤ -1 or ≥ 1 and $p \leq 0.05$ as differentially expressed.

We performed two orthologous analyses across datasets. We first determined genes and transcripts which were differentially up- or down-regulated at each infection time points between CF and non-CF epithelial cells. Then, we examined the lncRNA transcripts differentially expressed between the 0 h time point and 2, 4, and 6 h post-infection in both CF and non-CF groups analyzed separately. From this, we sorted out the differentially

expressed lncRNA transcripts which were found only in CF or in non-CF cells. The overlapped transcripts of the first set comprising the differentially expressed lncRNA transcripts of CF/non-CF analysis and second set comprising the differentially expressed transcripts at 2, 4, and 6 h post-infection, identified only in CF cells, and gave us the potential lncRNA transcripts with potential for association with *Pa* infection in CF epithelial cells.

Validation of Expression Level Using qRT-PCR

Quantitative PCR was performed using an ABI StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and TaqMan technology. TaqMan probes used (Applied Biosystems) were XIST (Hs01079824), MEG9 (Hs01593046), BLACAT1 (Hs03839366), and GAPDH (Hs02758991). Relative quantifications of the lncRNA level were carried out using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, and normalized with respect to *GAPDH* and for the expression levels to respective non-infected cells (T0). Each sample was assessed in triplicates to ensure experiment quality.

Statistical Analysis

Data were described as mean \pm SEM. Between-group differences were tested using the paired *t*-test. Values of *p* lower than 0.05 were considered significant; in the figures, statistically significant differences with $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***) are indicated.

Correlation Analysis of Gene Expression Data

Correlation analysis was carried out using Pearson's algorithm with the help of R package; rcorr. We observed the mRNA transcripts positively or negatively correlated with the overlapped lncRNAs from two analyses. Transcripts with an empirical *r*-score greater than 0.85 were considered to be positively regulated whereas transcripts with *r*-score less than -0.85 were considered to be negatively regulated and *p*-value less than 0.01 was considered as significant. We additionally performed enrichment analysis for the protein coding genes co-regulated with the lncRNAs using DAVID functional annotation tool.

RESULTS

Identification of Temporal Infection Signatures from RNA-Seq Data

For identifying differentially expressed genes and transcripts in CF compared to non-CF epithelial cells, we used *cuffdiff* and the reference gene and transcript annotations from the GENCODE version 23 for guiding the assembly. The *cuffdiff* output provided FPKM values, log₂-fold change value of CF upon non-CF for every time points studied. The numbers of genes differentially expressed at 0, 2, 4, and 6 h are found to be 297, 958, 281, and 439 respectively and a total of 336, 958, 336, and 518 transcripts respectively (Table 1). Their FPKM values and fold changes are summarized in Supplementary Table 3. The lncRNA annotation files were separately retrieved from the GENCODE database to extract all the significantly differentially expressed lncRNA transcripts. We identified a total of 25, 73, 15, and 26 differentially expressed lncRNAs, corresponding to the 0, 2, 4, and 6 h time points. The unique number of lncRNA transcripts differentially expressed throughout the dataset was found to be 108. These latter are shown in a Venn diagram (Figure 1) to visualize shared lncRNAs differentially expressed between CF



FIGURE 1 | Venn Diagram of differentially expressed lncRNA transcripts in CF vs. non-CF cells at each time point of infection.

TABLE 1 | Summary of genes and transcripts differentially expressed in CF vs. non-CF cells at each time point of infection.

| Differentially expressed genes/transcripts | 0 h (CF/non-CF) | 2 h (CF/non-CF) | 4 h (CF/non-CF) | 6 h (CF/non-CF) |
|--------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Genes | 297 | 958 | 281 | 439 |
| Transcripts | 336 | 958 | 336 | 518 |
| lncRNA transcripts | 25 | 73 | 15 | 26 |
| lncRNA genes | 21 | 73 | 15 | 22 |
| Unique lncRNA transcripts | | | 108 | |
| Unique lncRNA genes | | | 104 | |

and non-CF infected cells. Out of the 108 lncRNA transcripts, a total of 12 lncRNAs are differentially expressed in at least 2 time points. **Table 2** lists these lncRNAs, their cognate gene locus and functions as annotated from literature. Three of the 12 lncRNAs have been previously shown to be expressed in the human lung. The lncRNA RP11-44F21.5 has been previously suggested to be down-regulated in squamous cell carcinoma of the lung in the following analysis: <https://genevisible.com/perturbations/HS/Gene%20Symbol/RP11-44F21.5>. The two other lncRNAs,

LINC00704 and LINC00992, have been shown to be expressed in lungs, kidneys and salivary glands (Stelzer et al., 2016).

Highlighting Distinct Specific Infection Signatures in Non-CF and CF Cells

To identify the lncRNA transcripts specific of *Pa* infection, we used *cuffdiff* to compare the expression values for each time point against 0 h for CF and non-CF datasets separately. We retrieved the differentially expressed transcripts using

TABLE 2 | Summary of lncRNA genes differentially expressed in CF vs. non-CF cells for at least 2 of the time points of infection.

| Conditions differentially expressed | lncRNA | Ensembl ID | Function |
|-------------------------------------|----------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | |
| | CTD-2619J13.13 | ENST00000596379.1 ENSG00000268307.1 | CTD-2619J13.13 is a processed transcript type of long coding RNA. It belongs to chromosome 19 on the forward strand comprising 459 bp. |
| | LINC00862 | ENST00000367356.1 ENSG00000203721.5 | LINC00862 is a long Intergenic Non-Protein Coding RNA 862. It is also known as Small Integral Membrane Protein 16 or C1orf98. It belongs to chromosome 12, comprising 31,811 bp on reverse strand. |
| | CMB9-55F22.1 | ENST00000623846.1 ENSG00000279672.1 | CMB9-55F22.1 is a known pseudogene which is annotated as long coding RNA. It is found to have expressed in acute monoblastic/monocytic leukemia cell lines. It belongs to chromosome 11, encompassing 1,139 bp on forward strand |
| | POLR2J4 | ENST00000427076.5 ENSG00000214783.9 | POLR2J4 is expanded as Polymerase (RNA) II (DNA Directed) Polypeptide J4. It is a pseudogene, which is annotated as long coding RNA. It is also known as RPB11-Phi. It is found to be on chromosome 12 carrying 78,300 bps on reverse strand. It is studied to be expressed in majority all tissue types. |
| | WFDC21P | ENST00000566140.5 ENSG00000261040.6 | WFDC21P is expanded as WAP Four-Disulfide Core Domain 21 which is a pseudogene type of long coding RNA. It is also known as lncDC. The STAT3-Binding Long Non-coding RNA lnc-DC Controls Human Dendritic Cell Differentiation. It belongs to chromosome 17 containing 8,320 bp on reverse strand |
| | RP11-442H21.2 | ENST00000491934.2 ENSG00000269926.1 | RP11-442H21.2 is a known antisense long non-coding RNA. It is found to be expressed in bone marrow and cord blood. It belongs to chromosome 10 comprising 1,066 bp on reverse strand. |
| | RP11-890B15.2 | ENST00000533812.6 ENSG00000254842.6 | RP11-890B15.2 is a known long intergenic non-coding RNA. It has found to have some regulatory activities like CTCF binding, promoter seq binding. It belongs to chromosome 11 comprising 2,203 bps on reverse strand. |
| | RP11-445P17.8 | ENST00000449457.1 ENSG00000224034.1 | RP11-445P17.8 is a known lincRNA. It has found to be expressed in gallbladder and acting as an enhancer. It belongs to chromosome 10, 5,204 bp long on reverse strand. |
| | RP11-44F21.5 | ENST00000561705.1 ENSG00000260265.1 | RP11-44F21.5 is a known lincRNA. It has found to be expressed in bladder and brain. The lncRNA is studied to be downregulated in pancreatic cancer studies and lung squamous carcinoma with normal non-cancerous tissues while found upregulated between allergic house dust mite and non-allergic dust mite. This belongs to chromosome 4 comprising 3,016 bps. |
| | RP11-495P10.8 | ENST00000434245.2 ENSG00000231196.3 | RP11-495P10.8 is a long intergenic non coding RNA which has shown role in epigenetic modifications in liver and brain cells. The overall mean expression of RP11-495P10.8 from different datasets is 0.20 RPM, ranging from as low as 0.00 RPM to 7.29 RPM. It is studied to be expressed more in erythrocytic leukemia. It belongs to chromosome 1 spanning 4,971 bp on reverse strand. |
| | LINC00704 | ENST00000430998.6 ENSG00000231298.6 | LINC00704 is an RNA Gene, and is affiliated with the non-coding RNA class. It is found to have expressed in internal organs like lungs and kidneys and secretory tissue like salivary and pituitary gland. It belongs to chromosome 10 comprising 27,970 bps. |
| | LINC00992 | ENST00000504107.1 ENSG00000248663.6 | LINC00992 expanded as Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 992 is an RNA Gene, and is affiliated with the non-coding RNA class. It is also known as CTC-504A5.1. It is studied to have expressed in internal organs like lungs and kidneys and secretory tissue like salivary and pituitary gland. It belongs to chromosome 5 spanning the size 164,236 bps on forward strand. |

TABLE 3 | Genes and lncRNAs differentially expressed in CF and non-CF cells at different time points of infection compared to the non-infected status (0 h).

| Differentially expressed genes/transcripts | 2 h vs. 0 h | | 4 h vs. 0 h | | 6 h vs. 0 h | |
|--------------------------------------------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
| | CF | Non-CF | CF | Non-CF | CF | Non-CF |
| Genes | 72 | 587 | 99 | 75 | 272 | 140 |
| Transcripts | 72 | 603 | 102 | 76 | 305 | 146 |
| lncRNA transcripts | 2 | 53 | 1 | 7 | 17 | 5 |
| lncRNA Genes | 2 | 53 | 1 | 7 | 17 | 5 |
| Unique lncRNA transcripts | | | | 80 | | |
| Unique lncRNA genes | | | | 79 | | |

the same filters as mentioned previously. The total number of genes or transcripts, differentially expressed were found comparatively less in CF than in non-CF samples at 2 h vs. 0 h (Table 3). We further analyzed the common lncRNA transcripts differentially expressed at each time point in CF and non-CF datasets. Except for 2 up-regulated lncRNAs at 6 h vs. 0 h, we obtained two distinct profiles of lncRNAs as none of lncRNAs differentially expressed during infection in non-CF are common to those differentially expressed in CF cells (Figure 2). The FPKM values and fold changes of the up- and down-regulated transcripts are summarized in Supplementary Tables 4, 5, respectively.

For finding out the lncRNA signature specific to infected CF cells in the one hand and to non-CF cells in the other hand, we summarized overlaps between differentially expressed (both up and down) transcripts in the CF sets (Figure 3A) and in the non-CF sets (Figure 3B) respectively for each of the respective time points against non-infected time point (0 h). We found that 62 lncRNA transcripts (62 up-regulated) are specifically regulated in *Pa* infected non-CF epithelial cells, whereas 17 lncRNA transcripts (2 up- and 15 down-regulated) are specific of the CF epithelial cell response to the infection. The FPKM values and fold changes of the up-regulated transcripts in non-CF cells and the up- and down-regulated in CF cells are summarized in Supplementary Tables 6–8, respectively.

Among the lncRNA transcripts specific signature of infected CF cells, we selected two of them already studied in the literature, MEG9 and BLACAT1, for validation of their expression by qPCR. Thus, the pattern of expression found by *in silico* analysis for MEG9 and BLACAT1 was confirmed with a significant down regulation at 2 and 6 h post-infection, respectively (Figure 4). One lncRNA transcript, XIST, identified in the infected non-CF signature and already described by Greene's team comparing CF and non-CF samples, was measured by qPCR. Validation of its expression was not as clear as for MEG9 and BLACAT1. Indeed, we observed varying levels of expression between epithelial cells derived from male and female, independently of CFTR genotype, i.e., very low or no expression in male cells (Ct around 36 or undetermined) whereas high expression in female cells (Ct around 18.5) (data not shown).

Proteins Coding Transcripts Correlated with BLACAT1 and MEG9 Expression

The Gene Ontology analysis did not reveal protein-coding genes significantly correlated with BLACAT1 expression, but it identified protein coding transcripts positively and negatively correlated with lncRNA MEG9. Among the genes positively correlated, we observed 62.3% of proteins engaged in protein binding, 18.5% in positive regulation of cellular process and around 10% in extracellular matrix. The genes negatively correlated (17.4%) with lncRNA MEG9 were involved in structural components of ribosome (Table 4).

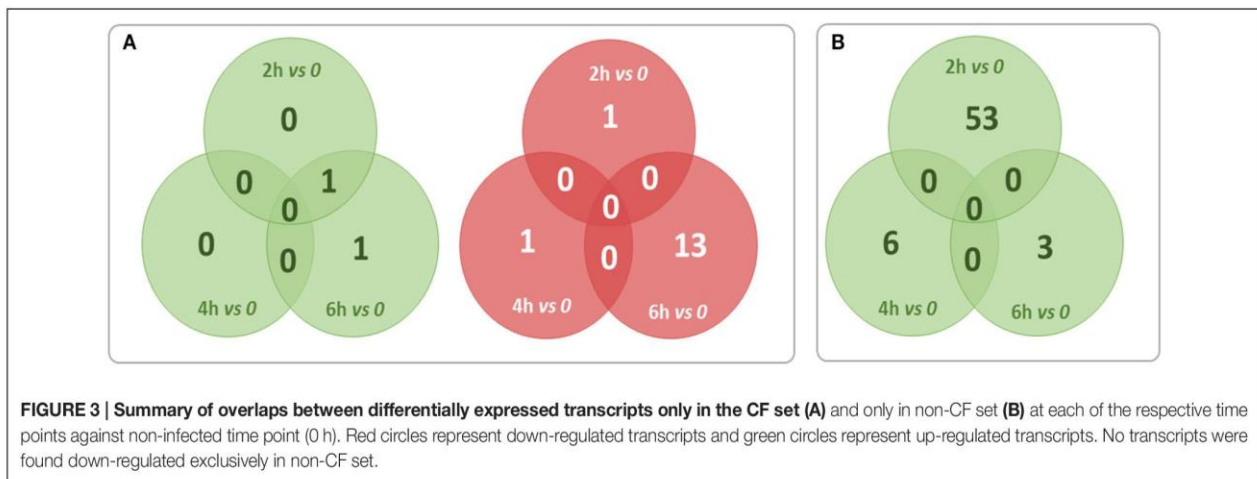
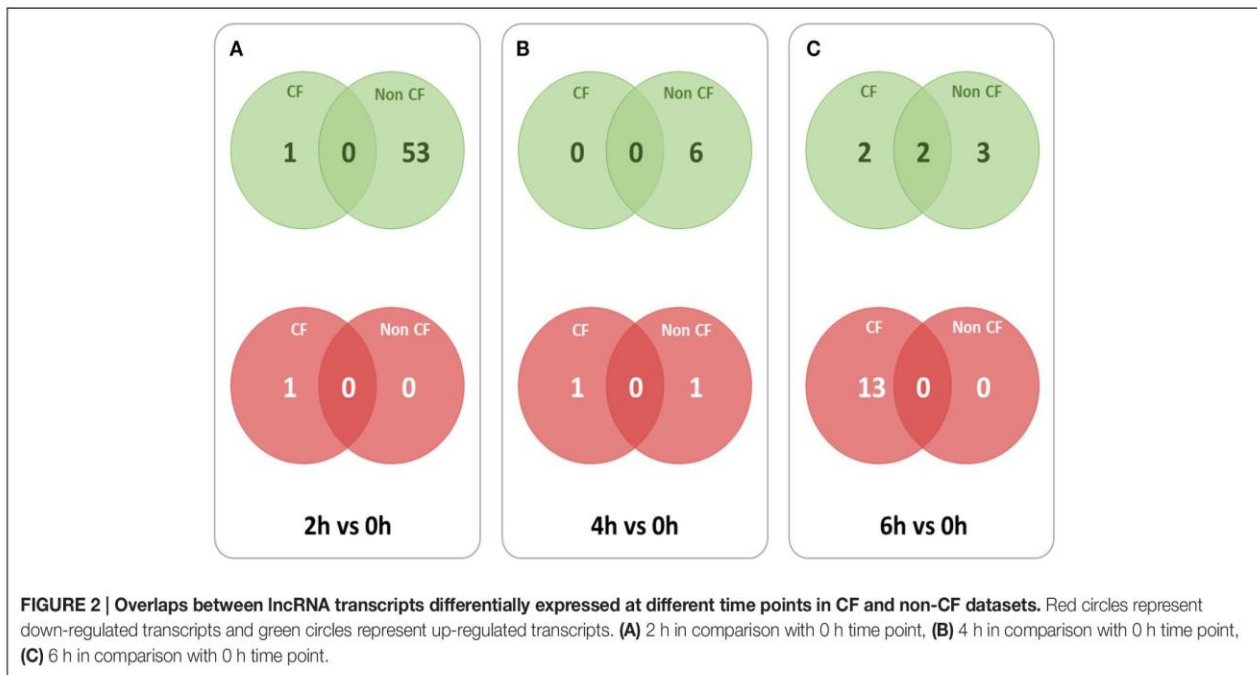
DISCUSSION

The airway epithelium is the first site in contact with inhaled pathogens. Its response to bacterial invasions activates innate immune mechanisms through the involvement of various receptors. In CF patients, this normal process is disturbed leading to a decrease of the bacterial clearance resulting in chronic infection in lungs.

Over the years, lncRNAs have been recognized as major regulators of multiple cellular processes among which the regulation of immune effectors. They can interact with transcription factors which is the case of the lncRNA NRON that inhibits the translocation of NFAT in the nucleus by sequestering it in the cytosol and so negatively regulating T-cell activation (Willingham et al., 2005). Three lncRNAs (murine NeST, human THRIL, and NEAT1) have been previously shown to regulate the innate immune response by modulating the transcription of cytokines such as IFN- γ , TNF- α , and IL-8 (Cullen, 2013; Gomez et al., 2013; Imamura et al., 2014; Li et al., 2014). It is also known that toll-like receptor (TLR) signaling can activate endogenous feedback-regulation networks to limit the potentially damaging effects of an excessive inflammation. This is the case with the lncRNA THRIL which helps in down-regulation to restrain TLR-induced gene activation (Li et al., 2014).

lncRNA expression is tissue-specific indicating a tight regulation that could be affected by *Pa* infection in CF patients. For this reason, we decided to explore the expression of lncRNAs in the infectious context of respiratory epithelial cells that are key cells involved in CF. CF vs. non-CF infected cells study brought 108 unique lncRNAs as differentially up- or down-regulated with 12 lncRNAs which are expressed in at least two time points. Among them, the lncRNAs, LINC00862, and CTD-2619J13, are differentially expressed at all four time points in spite of bacterial invasion. As such, they could be two potential signatures for CF. Most of the 108 unique lncRNAs was differentially expressed at 2 h, almost immediately after bacterial attack. According to Ensembl and lncRNAdb, some of these differentially expressed lncRNAs are involved in regulatory activities namely CTCF binding, promoter sequence binding transcripts and few were found differentially expressed in different tissues such as in lungs and in erythrocytes.

To pinpoint a specific signature related to infection in the CF vs. non-CF context, we took in account lncRNA transcripts specific to *Pa* infection expressed only in CF in one hand and in



non-CF cells in other hand from each time point (i.e., 2, 4, and 6 h) and compared with their expression in uninfected cells.

Numbers of lncRNAs differentially expressed for CF and non-CF cells are totally different with 17 and 62 lncRNAs, respectively. Among the lncRNAs belonging to the specific signature of *Pa* infected non-CF cells; we observed a well annotated lncRNA, XIST. As described by Greene's team⁹, we detected the lncRNA XIST more expressed in CF than in non-CF cells at the non-infected status (Fold change >4). Moreover, we observed that XIST expression is up-regulated in non-CF cells during infection at 4 and 6 h (FC > 2). Nonetheless, the validation of XIST by qPCR does not fit with the *in silico* analysis. Indeed, we observed differences of expression between cells from male and female donors but no differences of expression between CF and non-CF epithelial cells. This result is consistent with the literature as XIST is a lncRNA required for the establishment of

X-chromosome silencing in placental mammals. X inactivation is an early developmental process in mammalian females that transcriptionally silences one of the pair of X chromosomes, thus providing dosage equivalence between males and females (Furlan and Rougeulle, 2016). Due to the differences in the gender of donors, taken individually, values did not show the variations averaged *in silico* analysis. Other transcripts, ENST00000452120.6 and ENST00000398461.5 were found in the CF cells specific signatures. These transcripts are annotated as MEG3 (Maternally Expressed 3) which is a maternally imprinted gene with all spliced transcripts annotated as lncRNAs and is a well-known lncRNA tumor suppressor. MEG3 has been previously reported to regulate the TGF- β pathway genes by forming RNA-DNA triplex structures (Mondal et al., 2015). This pathway is frequently regulated during tissue injury and repair and the up-regulation of TGF- β is involved in lung fibrogenic

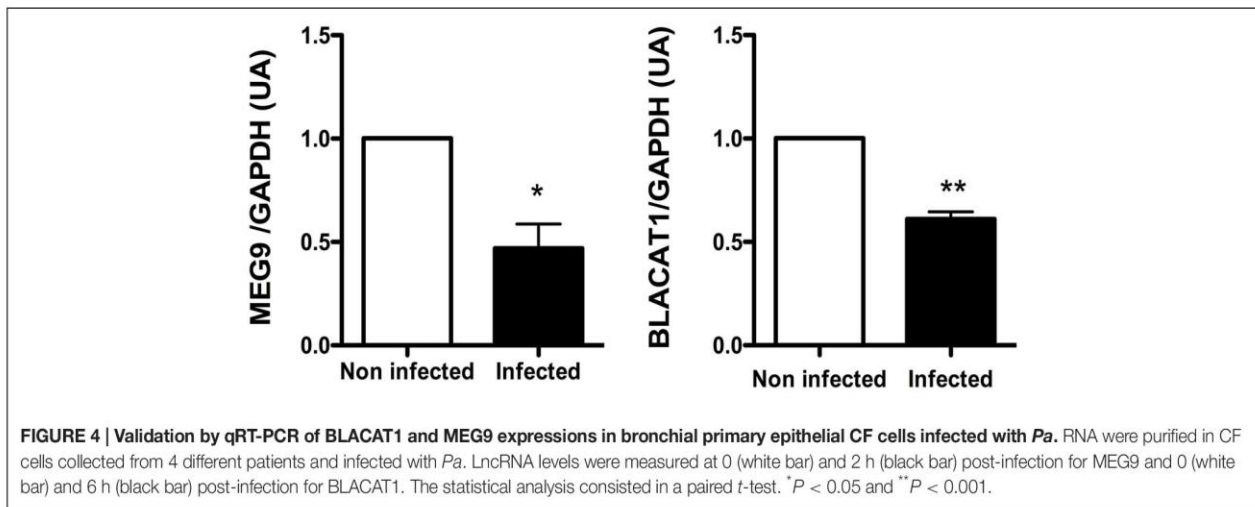


TABLE 4 | DAVID's GO terms for protein coding transcripts positively and negatively correlated with the lncRNA MEG9.

| Category | GO term | Count | Percentage | <i>P</i> -value | Benjamini corrected <i>p</i> -value |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------|------------|-----------------|-------------------------------------|
| GENES POSITIVELY CORRELATED IN EXPRESSION | | | | | |
| Biological process | Regulation of localization | 19 | 9.2 | 3.0E-4 | 4.6E-2 |
| | Positive regulation of cellular process | 38 | 18.5 | 7.0E-4 | 5.30E-02 |
| Cellular components | Extracellular matrix part | 10 | 4.8 | 1.3E-5 | 4.4E-4 |
| | Extracellular matrix | 14 | 6.8 | 3.1E-4 | 5.3E-3 |
| Molecular function | Protein binding | 129 | 62.3 | 1.60E-4 | 7.80E-3 |
| GENES NEGATIVELY CORRELATED IN EXPRESSION | | | | | |
| Molecular function | Structural constituent of ribosome | 4 | 17.4 | 1.9E-3 | 3.10E-2 |

diseases. The expression of the lncRNA MEG3 in signature could be associated with the absence of injury after invasion of *Pa* in non-CF. A recent study in mice characterized MEG3 as a novel pulmonary inflammatory regulator of bacterial infection through miR-138 (Li and Wu, 2016).

The highlighting of a specific signature in CF epithelial cells in response to *Pa* infection revealed 17 lncRNA transcripts. Among them, 4 lncRNA transcripts MEG9, BLACAT1, RP11-47714.4, and RP11-1334A24.5 overlapped with the 108 unique lncRNAs which are differentially expressed between CF and non-CF cells. RT-PCR gave a similar pattern of expression of MEG9 and BLACAT1 as from *in silico* analysis and validate the different signatures obtained with the computational analysis. ENST00000626538.1, otherwise known as lncRNA BLACAT1 (Bladder Cancer Associated Transcript 1), was found down-regulated in CF patients. Until now, BLACAT1, firstly characterized in bladder cancer, was also described to be involved in the development of gastric cancer. It has been shown that its depletion decreased the gastric cancer cell proliferation, motility and invasion (Hu et al., 2015). Since shedding and abnormal repair are characteristics of CF epithelial cells, it would be interesting to study whether their altered expression of BLACAT1 influences their repair, proliferation and migration. In our study, analysis did not reveal protein-coding gene significantly correlated with BLACAT1 expression. However,

as shown previously BLACAT1 could interact directly with other molecular partners than transcripts such as the proteins of the polycomb repressive complex 2 (PRC2) (He et al., 2013).

Concerning MEG9 (Maternally Expressed 9), a lncRNA belonging to the MEG family, it has been described to be up-regulated upon hypoxia in human endothelial cells and in a model of mouse ischemia (Voellenkle et al., 2016). In our study, MEG9 was found dramatically down-regulated 2 h post-infection compared to the non-infected status (0 h) in CF cells (Supplementary Table 8). From our correlation analysis of gene expression, MEG9 was found co-regulated positively with 226 and negatively with 25 protein coding genes. Gene ontology analysis showed that MEG9 was found positively co-regulated mostly with proteins engaged in protein binding (62.3%), in positive regulation of cellular process (18.5%) and few of them in extracellular matrix (Table 4), all processes involved in inflammation of the lung in CF (Cohen-Cyberknoh et al., 2013).

Our study showed that *Pa* infection altered the expression of lncRNAs in CF respiratory epithelial cells which could have a potential role in the innate immune system and thus could contribute to the maladaptive immune response observed in patients. We have experimentally validated the two potential transcripts namely MEG9 and BLACAT1 expression, which

were found differentially expressed in both CF/non-CF and infected/non-infected analyses. Further investigations either *in vitro* (respiratory epithelial cells in culture) or *in vivo* (study of conserved LncRNA (MEGs) in mice model of pulmonary infection) are necessary to understand the role of these lncRNAs in the innate immune response. The present study may contribute to provide further insight into the biological functions and molecular mechanisms of lncRNAs regulation in CF in which *Pa* infection plays a crucial role.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: LG, VB, and MC. Performed the biological experiments: LG, VB. Analyzed the data: RK, LG, VB, and VS. Wrote the paper: RK, VB, LG, MC, LP, HC, and VS.

REFERENCES

- Balloy, V., Varet, H., Dillies, M.-A., Proux, C., Jagla, B., Coppée, J.-Y., et al. (2015). Normal and cystic fibrosis human bronchial epithelial cells infected with *Pseudomonas aeruginosa* exhibit distinct gene activation patterns. *PLoS ONE* 10:e0140979. doi: 10.1371/journal.pone.0140979
- Cohen-Cymberek, M., Kerem, E., Ferkol, T., and Elizur, A. (2013). Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications. *Thorax* 68, 1157–1162. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-203204
- Cullen, B. R. (2013). Making a NeST for a persistent virus. *Cell Host Microbe* 13, 241–242. doi: 10.1016/j.chom.2013.02.016
- Elborn, J. S. (2016). *Cystic Fibrosis*. Available online at: www.thelancet.com, 388.
- Furlan, G., and Rougeulle, C. (2016). Function and evolution of the long noncoding RNA circuitry orchestrating X-chromosome inactivation in mammals. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 7, 702–722. doi: 10.1002/wrna.1359
- Gomez, J. A., Wapinski, O. L., Yang, Y. W., Bureau, J.-F., Gopinath, S., Monack, D. M., et al. (2013). The NeST long ncRNA controls microbial susceptibility and epigenetic activation of the interferon- γ locus. *Cell* 152, 743–754. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.015
- He, W., Cai, Q., Sun, F., Zhong, G., Wang, P., Liu, H., et al. (2013). linc-UBC1 physically associates with polycomb repressive complex 2 (PRC2) and acts as a negative prognostic factor for lymph node metastasis and survival in bladder cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 1528–1537. doi: 10.1016/j.bbdis.2013.05.010
- Hu, Y., Pan, J., Wang, Y., Li, L., and Huang, Y. (2015). Long noncoding RNA linc-UBC1 is negative prognostic factor and exhibits tumor pro-oncogenic activity in gastric cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 594–600.
- Imamura, K., Imamachi, N., Akizuki, G., Kumakura, M., Kawaguchi, A., Nagata, K., et al. (2014). Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli. *Mol. Cell* 53, 393–406. doi: 10.1016/j.molcel.2014.01.009
- Li, R., and Wu, M. (2016). Long noncoding RNA MEG3-4 regulates IL-1 β during pulmonary bacterial infection by repressing microRNA-138. *J. Immunol.* 196(1 Suppl.), 127.9.
- Li, R., Zhu, H., and Luo, Y. (2016). Understanding the functions of long noncoding RNAs through their higher-order structures. *Int. J. Mol. Sci.* 17:702. doi: 10.3390/ijms17050702
- Li, Z., Chao, T.-C., Chang, K.-Y., Lin, N., Patil, V. S., Shimizu, C., et al. (2014). The long noncoding RNA THRIL regulates TNF expression through its interaction with hnRNPL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 1002–1007. doi: 10.1073/pnas.1313768111
- McKiernan, P. J., Molloy, K., Cryan, S. A., McElvaney, N. G., and Greene, C. M. (2014). Long noncoding RNA are aberrantly expressed *in vivo* in the cystic fibrosis bronchial epithelium. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 52, 184–191. doi: 10.1016/j.biocel.2014.02.022
- Mondal, T., Subhash, S., Vaid, R., Enroth, S., Uday, S., Reinius, B., et al. (2015). MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF- β pathway genes through formation of RNA-DNA triplex structures. *Nat. Commun.* 6:7743. doi: 10.1038/ncomms8743
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B., Salzberg, S. L., et al. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5, 621–628. doi: 10.1038/nmeth.1226
- Ouyang, J., Zhu, X., Chen, Y., Wei, H., Chen, Q., Chi, X., et al. (2014). NRAV, a long noncoding RNA, modulates antiviral responses through suppression of interferon-stimulated gene transcription. *Cell Host Microbe* 16, 616–626. doi: 10.1016/j.chom.2014.10.001
- Palmer, G. C., and Whiteley, M. (2015). Metabolism and pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* infections in the lungs of individuals with cystic fibrosis. *Microbiol. Spectr.* 3. doi: 10.1128/microbiolspec.MBP-0003-2014
- Rinn, J. L., and Chang, H. Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 145–166. doi: 10.1146/annurev-biochem-051410-092902
- Saayman, S. M., Ackley, A., Burdach, J., Clemson, M., Gruenert, D. C., Tachikawa, K., et al. (2016). Long non-coding RNA BGAs regulates the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol. Ther.* 24, 1351–1357. doi: 10.1038/mt.2016.112
- Scaria, V., and Pasha, A. (2012). Long non-coding RNAs in infection biology. *Front. Genet.* 3:308. doi: 10.3389/fgene.2012.00308
- Sigdel, K. R., Cheng, A., Wang, Y., Duan, L., and Zhang, Y. (2015). The emerging functions of long noncoding RNA in immune cells: autoimmune diseases. *J. Immunol. Res.* 2015, 1–9. doi: 10.1155/2015/848790
- Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., et al. (2016). The genecards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. *Curr. Protoc. Bioinform.* 54, 1.30.1–1.30.33. doi: 10.1002/cpbi.5
- Tsai, M.-C., Spitale, R. C., and Chang, H. Y. (2011). Long intergenic noncoding RNAs: new links in cancer progression. *Cancer Res.* 71, 3–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2483
- Voellenkle, C., Garcia-Manteiga, J. M., Pedrotti, S., Perfetti, A., De Toma, I., Da Silva, D., et al. (2016). Implication of long noncoding RNAs in the endothelial cell response to hypoxia revealed by RNA-sequencing. *Sci. Rep.* 6:24141. doi: 10.1038/srep24141

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from two French non-profit cystic fibrosis organizations, Vaincre la mucoviscidose and Association Gregory Lemarchal. The analysis was funded by CSIR, India through Grant BSC0123(GENCODE-C). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Authors also acknowledge Dr. Srinivasan Ramachandran for editorial help.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00218/full#supplementary-material>

- Willingham, A. T., Orth, A. P., Batalov, S., Peters, E. C., Wen, B. G., Aza-Blanc, P., et al. (2005). A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT. *Science* 309, 1570–1573. doi: 10.1126/science.1115901
- Xie, N., and Liu, G. (2015). ncRNA-regulated immune response and its role in inflammatory lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 309, L1076–L1087. doi: 10.1152/ajplung.00286.2015
- Zhang, Q., Chen, C.-Y., Yedavalli, V. S., and Jeang, K.-T. (2013). NEAT1 long noncoding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression. *MBio* 4:e00596-12. doi: 10.1128/mbio.00596-12

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Balloy, Koshy, Perra, Corvol, Chignard, Guillot and Scaria. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Résumé thèse – Léa Perra

Étude du rôle de CHAC1 dans la modulation de la réponse des cellules épithéliales bronchiques infectées par *Pseudomonas aeruginosa* dans le contexte de la mucoviscidose

Dans la mucoviscidose (CF pour *Cystic Fibrosis*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) colonise les voies respiratoires, conduisant à une inflammation chronique de l'épithélium bronchique. Une analyse transcriptomique antérieure nous a permis d'identifier *CHAC1* comme un gène différentiellement exprimé entre les cellules épithéliales bronchiques primaires de patients CF et de donneurs sains non-CF, au niveau basal et au cours de l'infection à *P. aeruginosa*. *CHAC1* est une protéine dégradant le glutathion et associée au stress du réticulum endoplasmique et à l'apoptose.

L'objectif principal de ce travail était de comprendre la contribution de *CHAC1*, en particulier dans la réponse inflammatoire et l'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires.

Nous avons donc, dans un premier temps, confirmé que *CHAC1* est surexprimé au niveau ARNm dans les cellules épithéliales bronchiques primaires non-CF par rapport aux cellules CF. Nous avons observé que *P. aeruginosa* et deux de ses facteurs de virulence, le LPS et la flagelline, induisent l'expression de *CHAC1* dans les cellules non-CF. L'expression de *CHAC1* induite par le LPS est indépendante de PERK mais implique ATF4. De plus, nous avons observé qu'une réduction de l'expression de *CHAC1* est associée, après stimulation par du LPS et de la flagelline, à une modulation des marqueurs inflammatoires notamment l'IL-8, l'IL-6, CCL2 et PGE2. Enfin, nous avons montré que *P. aeruginosa* n'est pas capable d'induire de l'apoptose dans la lignée de cellules épithéliales bronchiques NCI-H292.

Ces résultats suggèrent que *CHAC1* est impliqué dans la régulation de l'inflammation des cellules bronchiques au cours de l'infection à *P. aeruginosa* et la régulation de l'expression de *CHAC1* dans les cellules CF pourrait contribuer à la réponse inflammatoire excessive et chronique observée chez les patients atteints de mucoviscidose.

Mots clés : Mucoviscidose – CHAC1 – *Pseudomonas aeruginosa* - Inflammation