HAL
open science

Inflammation pulmonaire et rôle des microARN dans la mucoviscidose

Pauline Bardin

To cite this version:

Pauline Bardin. Inflammation pulmonaire et rôle des microARN dans la mucoviscidose. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS046 . tel-02935859

HAL Id: tel-02935859

https://theses.hal.science/tel-02935859v1

Submitted on 10 Sep 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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 394

Laboratoire de Physiopathologie et phénogénomique de la mucoviscidose / UMRS_938

Inflammation pulmonaire et rôle des microARN dans la mucoviscidose

Présentée par

Pauline BARDIN

Pour obtenir le grade de

Docteure en Sciences de Sorbonne Université

Spécialité Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Soutenue le

26 septembre 2019

Devant le jury composé du :

Professeure Annick CLEMENT	Présidente du jury
Professeure Pascale FANEN	Rapportrice
Docteure Magali TAULAN	Rapportrice
Docteure Emilie BONCOEUR	Examinatrice
Docteur Jacky JACQUOT	Examinateur
Professeure Rozen LE PANSE	Examinatrice
Docteur Olivier TABARY	Directeur de thèse

« Chaque fois que nous récoltons un renseignement, les choses se compliquent un peu plus. »

Agatha Christie

« Lorsque vous avez éliminé l'impossible, ce qui reste, si improbable soit-il, est nécessairement la vérité. »

Arthur Conan Doyle

« Les folies sont les seules choses qu'on ne regrette jamais. »

Oscar Wilde

Remerciements

A tous les membres de mon jury, un grand merci d'avoir accepté de participer à cette thèse. Nos chemins se sont croisés à un moment où un autre durant ma thèse mais surtout lors de congrès. Merci au Professeure Annick Clément qui me fait l'honneur de présider ce jury. Au Professeure Pascale Fanen et Docteure Magali Taulan, mes rapportrices, merci de consacrer de votre temps à l'évaluation de ce manuscrit. Merci également pour tous vos conseils et moments partagés lors des Basic Sciences. J'adresse ensuite mes remerciements à mes examinatrices, qui m'auront suivie depuis le début de ma thèse à travers mes comités de suivi de thèse, Professeure Rozen Le Panse et Docteure Emilie Boncoeur et à mon examinateur Jacky Jacquot.

Olivier, tu auras été mon directeur de thèse pendant 3 ans, durant cette période, tu m'as accordé ta confiance et une totale autonomie. Merci pour ta disponibilité, tes conseils, ta gentillesse, de m'avoir fait autant voyager pour présenter mes résultats. Merci d'avoir demandé à un orchestre de me chanter « joyeux anniversaire » lors de mon tout premier congrès de thèse. Merci de m'avoir attendu quand j'ai dû courir à travers l'aéroport en Allemagne parce que j'avais perdu ma CNI (même si j'avais quand même mon passeport, donc en vrai pas de quoi paniquer). Je n'en reviens toujours pas d'avoir survécu à un oral en anglais aux USA devant une salle de conférence qui s'apparentait plus à une salle de concert vu les dimensions. Je te remercie de m'avoir permis de mener à bien le projet que j'avais conçu pour le concours de l'ED et j'espère avoir été à la hauteur. Merci infiniment pour cet enrichissement professionnel.

Harriet, merci de m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire, d'être toujours souriante, de te soucier du bien-être de tout le monde et de m'avoir permis d'assister aux réunions staff de l'hôpital Trousseau.

Philippe, merci pour l'opportunité de stage à la fin de ma licence. Cette expérience m'aura donné goût à la recherche et m'aura conduite à revenir dans ce laboratoire.

Florence, tu auras été la première rencontre dans ce laboratoire en 2014 lors de mon tout premier stage qui aura marqué mon esprit. Merci de m'avoir formé aux différentes techniques d'expérimentation de laboratoire, appris la danse de Hitch, d'avoir partagé ta passion pour Disney et Harry Potter (je me sentais moins seule) et d'avoir laissé les Kinder parce que tu préférais le Nutella. Tu m'avais souhaité de faire une bonne thèse comme ça avait été le cas pour toi avec Olivier, j'espère que tu te diras que j'ai réussi.

Nathalie, tes conseils en tant qu'experte technique m'auront bien aidée. Je regrette tout de même que nous n'ayons jamais eu l'occasion de pouvoir travailler ensemble sur mon projet.

Tobias, ton soutien moral n'a jamais fait défaut, merci. Ta gentillesse est ta plus grande faiblesse, j'espère avoir réussi à te donner un peu de répondant pour au moins t'affirmer un minimum et que les gens arrêtent d'en profiter. Merci pour l'aide technique que tu auras apporté sur ce projet pendant les quatre derniers mois de ma thèse et pour la relecture et les corrections de mon manuscrit.

Julie, ma réussite au concours de l'ED est en partie due à notre cohabitation de bureau pendant quelques semaines à la fin de mon stage de M2. Merci pour nos conversations et nos fous rires pendant cette période. Je te souhaite de faire une thèse enrichissante qui te portera vers de nouveaux horizons.

Tania, la tornade du labo en 2014, j'admirerai toujours ta perspicacité vis-à-vis des gens et ton aplomb. Tu t'es envolée vers d'autres contrées avec ton poste à MSF mais je suis ravie de savoir que tu es de retour en France parmi nous. Nos retrouvailles se sont soldées par une discussion de six heures ! On est dingue mais en même temps, tellement d'expériences à partager, c'était indispensable.

A mes trois poussins qui auront rythmé ma troisième année de thèse, Audrey, Gabrielle et Victoire. Audrey, j'espère que grâce à moi le Western blot n'a plus aucun secret pour toi. Gabrielle, je t'ai transmise en tant que jeune *padawan* mon savoir sur les microARN. Je suis ravie de vous avoir rencontrées, de vous avoir encadrées et surtout que vous ayez toutes atteint l'objectif que vous vous étiez fixé. Le bureau des étudiants me paraît bien vide sans vous. Merci d'avoir été présentes pendant 6 mois, de m'avoir divertie pendant mes pauses de rédaction (et pas que d'ailleurs… mais ça valait le coup de rester dans ce bureau avec vous), d'avoir amené joie et soutien pendant que je me prenais la tête sur *endnote* et la mise en page de ma thèse.
Julia, mon premier poussin, merci pour ton grain de folie, tes danses improvisées dans le labo et nos conversations dans le bureau, surtout quand nous étions les deux seules rescapées de l'été 2019.

Merci aux autres membres de l'équipe (Astrid, Christophe, Claire, Floriane, Jeanne, Juliette, Léa M, Lhousseine, Loïc, Manon, Nawal, Viviane) pour leurs conseils avisés et la bonne humeur au laboratoire. Merci à toutes les personnes qui sont passées dans le labo (Estelle, Guillaume, Hortense, Kristin, Laura, Nicolas, Sophie, Xavier).

Merci aux personnes co-organisatrices de mon premier congrès de l'école doctorale (Delphine, Héloïse, Yuan, Jennifer, Marion, Lea, Thomas, Sarah et Anastasia). Je pense que je n'aurai jamais autant lu d'abstract que pendant la sélection des candidats pour l'oral.

Jennifer et Marion, mes deux compatriotes de Master qui m'auront suivie dans le centre de recherche Kourilsky à Saint-Antoine, dans des équipes complètement différentes de prime abord. Merci pour votre soutien indéfectible pendant ces 3 ans. On aura partagé des aventures toutes plus folles les unes que les autres : le ski interasso, doc'up, l'organisation du congrès de notre ED, un voyage dans les Landes, l'organisation du séminaire annuel du CRSA en mode Harry Potter et Fort Boyard, un voyage à Londres HP et un voyage à Granollers. Je pense que sans vous, cette aventure qu'est la thèse n'aurait pas été la même et surtout pas aussi géniale. Merci, mes amies, d'avoir contribué à mon bonheur.

Poudlargenne. Un mot, une aventure. Si on m'avait dit un jour que je devrai manager des réunions qui partent tout le temps en cacahuète (#Titou), que je serai à la tête d'un groupe de doctorant organisant une session scientifique, l'animation de la journée et de la soirée, que je changerai mon mot de passe d'ordi pour pouvoir tout garder secret jusqu'à la fin, je pense que j'aurai dit pourquoi pas, c'est parti ! Merci à vous, Camille, Emilie, Grégoire, Indira, Marion et Jennifer. Ce projet m'a réellement passionné, de la fusion de nos idées à leurs réalisations, de la trésorerie, aux achats et à la communication avec la chargée de clientèle de l'hôtel pour la planification de tous les évènements. En l'espace de quelques mois seulement, on aura réussi le pari de créer une session KourilQuizz, poster *teasing* et présentation de l'animation Harry Potter ; l'animation en elle-même où on aura fait se balader tous les membres du CRSA partout dans le château pour une conclusion épique en mode Fort Boyard lors de la soirée qui s'est soldée par un tsunami humain. Et le plus valorisant, on a tenu le pari de mixer tout le monde, quel que soit le statut, l'âge ou l'équipe, et ça c'était top !
Emilie, merci à MaîtreCapello pour ton œil de lynx pour la relecture et les corrections de mon manuscrit.

Merci à toutes les autres personnes du centre avec qui j'ai pu échanger pendant cette thèse.

Je n'ai pas seulement passé trois ans de ma vie professionnelle au laboratoire, mais aussi à la Cité des Sciences et de l'Industrie au cours de la mission doctorale de médiation scientifique que j'ai effectuée. Je tiens à remercier toutes les personnes qui auront croisé ma route. Cette expérience a été des plus enrichissantes. Un jour par semaine pendant 3 ans, ma bouffée d'oxygène. Grâce à vous j'ai acquis plus d'aisance à l'oral et les échanges avec le public qu'il soit scolaire ou grand public étaient incroyables.

Un merci particulier à Coco, ma tutrice, tu auras égayé ma première année de thèse et je regrette que nos chemins se soient si vite séparés. Tu m'auras initiée à toutes les bases de la médiation et appris que dans la vie, c'est important de travailler mais encore plus de partager sa joie avec les personnes qui nous entourent qu'elles soient proches de nous ou non.

Elodie, il n'y a que toi qui pouvait croire dès notre première rencontre qu'on allait devenir amies. Personnellement je me suis juste dit, qui c'est cette folle. Comme quoi après deux festivals, des concerts, un voyage au Canada (une intoxication alimentaire…), un mariage et des corco, tu avais totalement raison ! Sans toi, ma mission à la Cité n'aurait pas été aussi fun !

Laure, merci d'avoir toujours pris les médiations des plus grands pour me laisser les petits, tous des amours. Ta représentation pour Pizzly restera gravée dans ma mémoire et on refait quand tu veux des séances de psy-moquette, ou un jacuzzi karaoké !

Gilles, merci pour cette opportunité de passer de la cité des enfants à explora chez les vivants-environnement. Grâce à ça, j'ai pu prendre en charge, sous la direction de Valérie, le projet de médiation « Cantine du microbiote » qui m'aura donné du fil à retordre, de nombreuses présentations biblio mais une expérience incomparable. Mes deux ans chez vous auront été rythmés par « vision tu seiches », « valse des glaciations », « bar à plantes », « microbiote nous ne sommes pas seuls » et « cantine du microbiote ».

Merci à l'Ecole de la médiation, par laquelle j'ai pu effectuer des formations en médiation, en pratique théâtrale et en journalisme scientifique. Elles contribueront toutes à ma future carrière.

A tous les membres de l'association Doc'Up et plus particulièrement à Caroline, Domitille, Elise, Héloïse, Karol, Mélanie et Sophie, merci pour tout ! J'aurai été votre trésorière pendant deux ans. Légèrement très à cheval sur la règlementation mais ça n'aura pas fait de mal à l'asso. Une trésorerie n'a plus aucun secret pour moi : gestion, demande de financement, retour de financement… En vous souhaitant que mon successeur soit au taquet. Merci à tous les *afterworks* professionnels qui ont eu lieu et qui m'ont permis de concevoir mon projet professionnel de manière plus claire.

Maëva, ma jumelle des îles, je regrette que nos thèses n'aient pas évoluées de la même manière mais j'espère que tu trouveras ta voie que ce soit dans la recherche ou dans l'enseignement, peu importe. Je suis heureuse de te compter parmi mes amies et encore plus ravie de t'avoir convaincue de faire la douche géante glacée à Granollers. Comme quoi mon petit grain de folie arrive à atteindre les plus réticentes. Merci pour ton amitié, qui ne s'étiole pas au fil des ans.

Adèle, mon ti chou, mon binôme de toujours pendant le Master. On en aura subi du stress ensemble pendant ces deux années mais notre complémentarité aura eu raison de tous ces oraux et partiels et regarde où ça nous a mené, toutes les deux en thèse. Enfin pour moi plus pour très longtemps. Ma folie t'aura aussi touchée, j'ai réussi à te convaincre de participer à l'un de mes rêves d'être l'une des couleurs dans le ciel de l'île de la Réunion. A nous deux on ne faisait pas les fières au début mais quelle expérience sensationnelle de faire du parapente !

Hélène et Marion, mes deux amies de la musique. Vous m'avez constamment rappelé que je travaillais pour le bien-être et la santé des gens, que celui-ci était important, même plus que votre travail. Pourtant la musique et tous les concerts auxquels j'ai pu assister, grâce à vous pour certains, m'auront aidé à tenir le cap en me changeant les idées et en me faisant décompresser quand ça n'allait pas. Merci à vous deux !

Alexia, Juliette et Laëtitia, 9 ans qu'on a eu notre bac et toujours au rendez-vous, surtout pour les concerts. Adrian, Alexandra, Aude, Benjamin, Cindy, Manon, Maud, Sandy, merci à tous pour votre amitié.

Justine, ma meilleure amie d'enfance, ma grande sœur de cœur. Merci pour ton soutien et ton amour inconditionnel. Toutes les deux on sait que même dans 50 ans on sera toujours ensemble à débriefer des derniers potins. Merci d'avoir essayé de comprendre sur quoi je travaillais à maintes reprises alors que tu n'es pas dans le domaine et d'être plus pressée que moi d'être à la soutenance.

Merci à toute ma famille, de métropole et de l'île de la Réunion.

Merci à mon grand frère, Stéphane, de me montrer que l'artistique s'allie très bien au scientifique dans ce monde. Merci pour ton amour et ton soutien.

Mon plus grand merci est destiné à mes parents, Josette et Joël, on dit souvent qu'on ne choisit pas sa famille, mais si ça avait été le cas, je vous aurai choisi tout de suite. Merci pour votre amour, votre gentillesse, votre altruisme, votre persévérance, votre courage, votre indépendance et votre côté têtu qui se retrouve tous en moi. Je suis extrêmement fière de vous avoir pour parents. Notre vie n'aura pas été un long fleuve tranquille, mais qu'importe, parce que je sais que toutes les aventures et les épreuves traversées m'ont rendu plus forte. Je vous serai éternellement reconnaissante et j'espère que vous serez fiers de moi et du travail que j'aurai accompli pendant cette thèse.

A tous ceux qui ne s'arrêteront pas à la lecture de mes remerciements mais qui liront ma thèse, je vous souhaite à tous une bonne lecture !

Sommaire

AVANT-TEXTE **1**
I. Liste des figures **2**
II. Liste des tableaux **4**
III. Liste des abréviations **5**

AVANT-PROPOS **11**

INTRODUCTION **13**
I. La mucoviscidose **14**
1. Epidémiologie 14
2. Historique 16
3. Gène et protéine CFTR 17
1) Gène *CFTR* 17
2) Protéine CFTR 18
3) Localisation de CFTR 19
4) Fonction de CFTR 20
a. Canal à ions chlorures 20
b. Transporteurs 20
c. Régulateur d'autres canaux 21
d. Régulation de CFTR 22
5) Mutations de CFTR 22
a. Mutations de classe 1 24
b. Mutations de classe 2 24
c. Mutations de classe 3 25
d. Mutations de classe 4 25
e. Mutations de classe 5 25
f. Mutations de classe 6 25
g. Hétérogénéité phénotypique de la mucoviscidose 25
4. Diagnostic et dépistage de la mucoviscidose 26
5. Manifestations cliniques extra-pulmonaires 28
1) Digestives 28
a. Atteinte gastro-intestinale 28
b. Atteinte pancréatique 29
c. Atteinte hépatobiliaire 30

2) Génitales 30
3) Osseuses 31
4) Rénales 31
5) Glandes sudoripares 31
6) ORL 31
6. Manifestations cliniques pulmonaires 32
1) Physiologie pulmonaire 32
a. Généralités 32
b. Epithélium des voies aériennes 33
c. Liquide de surface des voies aériennes 37
2) Physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose 39
3) Inflammation pulmonaire 40
a. Généralités : Défense immunitaire et inflammation 40
b. Inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose 42
c. Les voies de signalisation impliquées dans l'inflammation 49
d. Rôle de CFTR dans l'inflammation 56
7. Stratégies thérapeutiques 58
1) Prise en charge de l'atteinte digestive, pancréatique, hépatobiliaire et osseuse 58
2) Prise en charge de l'atteinte pulmonaire 58
a. Thérapie améliorant la clairance mucociliaire 59
b. Thérapie anti-infectieuse 60
c. Thérapie anti-inflammatoire 61
d. Transplantation pulmonaire 62
3) Nouvelles stratégies thérapeutiques 62
a. Thérapie génique 62
b. Thérapie protéique 65
c. Thérapie anti-inflammatoire 68

II. Les microARN 69

1. Découverte des miARN 69
2. Principe de l'ARN interférence 69
3. Biosynthèse des miARN 70
   1) Organisation génomique 70
   2) Transcription du pri-miARN 71
   3) Maturation nucléaire du pri-miARN 72
   4) Export dans le cytoplasme 73
   5) Maturation cytoplasmique du pre-miARN 73
   6) Appariement à l'ARNm cible 74
4. Mode d'action des miARN 76
   1) Interaction avec les transcrits 76
   2) Les miARN mimics 77
   3) Les miARN inhibiteurs 77
5. Outils bio-informatiques pour la prédiction des sites cibles 79
6. MiARN et mucoviscidose 79
   1) Régulation de *CFTR* par les miARN 79
   2) Régulation des processus inflammatoires par les miARN 82
   3) Régulation de l'obstruction bronchique et de l'infection par les miARN 85
7. MiARN : biomarqueur et thérapies 86
   1) MiARN : biomarqueur 86
      a. Généralités 86
      b. Applications 88
   2) MiARN : perspectives thérapeutiques 89
      a. Thérapies de remplacement 89
      b. Thérapies de blocage 90
      c. Voies d'administration 91
      d. Applications thérapeutiques 92

OBJECTIF DU TRAVAIL **95**

RESULTATS.. ..... **98**

I. Article : *Small RNA and transcriptome sequencing reveal the role of miR-199a-3p in inflammatory processes in cystic fibrosis airways* **99**

1. Contexte de l'étude 99
2. Résultats 99
3. Conclusion 100
4. Article 100
5. Résultats complémentaires 115
6. Résultats de révision de l'article 116

II. Origine de la dérégulation de miR-199a-3p **120**

1. Matériels et méthodes 120
2. Contexte pro-/anti-inflammatoire 123
   1) Contexte pro-inflammatoire 123
   2) Contexte anti-inflammatoire 126
3. Dysfonction intrinsèque de *CFTR* 126
4. Modulation calcique 128
5. Infection par *Pseudomonas aeruginosa* 132
6. Conclusion 133

III. Interaction entre les miARN **134**

1. Matériels et Méthodes 134
2. Régulation de NFκB1 par miR-9-5p 136
3. Interaction entre miR-199a-3p, miR-636 et miR-9-5p 136
4. Lien entre miR-9-5p et miR-199a-3p 138
5. Spécificité des transfections 139
6. Impact de la co-transfection de deux miARN sur l'activité NF-κB, la sécrétion en IL-8 et IL-6 139
7. Conclusion 141

IV. Article : *miR-636, a newly-identified actor for the regulation of pulmonary inflammation in cystic fibrosis* **142**

1. Contexte de l'étude 142
2. Résultats 142
3. Conclusion 143

4. Article 143
V. Biomarqueurs 168
1. Matériels et méthodes 168
2. Plasmas 169
3. Neutrophiles 171
4. Conclusion 172
VI. *Small RNAseq* et *RNAseq* – Vertex 173
1. Matériels et méthodes 173
2. Résultats 173
1) *RNAseq* - Vertex 174
2) *Small RNAseq* 177

DISCUSSION 178
I. *Small RNAseq* & *RNAseq* : Dérégulation de miR-199a-3p et conséquences sur la voie NF-κB 180
II. Régulation de l'expression de miR-199a-3p 184
III. Interaction entre les miARN 188
IV. Rôle de miR-636 sur l'inflammation 191
V. MiARN : biomarqueurs 195
VI. *SmallRNAseq* & *RNAseq* - Vertex® 196

BIBLIOGRAPHIE 198

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES 227
I. Liste des publications 228
II. Listes des communications dans le cadre de congrès 228
1. Orales 228
2. Affichées 229
III. Liste des congrès organisés 229
IV. *Travel Grant* 229

ANNEXES…… 230
Revue : Mucoviscidose : dans la ligne des miR……231
Revue : *Emerging microRNA therapeutic approaches for cystic fibrosis*……240

AVANT-TEXTE

I. Liste des figures

Figure 1 : Prévalence de la mucoviscidose pour 100 000 habitants dans le monde. 14

Figure 2 : Prévalence de la mucoviscidose pour 100 000 habitants en France 14

Figure 3 : Prévalence des naissances CF et des mutations les plus communes pour une sélection de pays..... 15

Figure 4 : Du gène *CFTR* à l'ARNm. 17

Figure 5 : Schéma montrant l'organisation transmembranaire des différents domaines de la protéine CFTR et le modèle théorique de la protéine CFTR humaine..... 18

Figure 6 : Expression globale de *CFTR* humain. 19

Figure 7 : Immunomarquage du canal CFTR au niveau apical de la membrane d'une cellule ciliée bronchique. 20

Figure 8 : Régulation des canaux CaCC, ORCC, ENaC et ROMK par CFTR. 21

Figure 9 : Mécanismes de régulation du canal CFTR 22

Figure 10 : Schématisation des principales mutations le long du gène *CFTR* 23

Figure 11 : Classification des mutations du gène *CFTR* en fonction de leurs conséquences fonctionnelles 23

Figure 12 : Localisation de la phénylalanine en position 508 sur l'organisation structurelle de la protéine CFTR 24

Figure 13 : Dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France 27

Figure 14 : Anatomie de l'appareil respiratoire ; voies supérieures et inférieures 32

Figure 15 : Représentation des voies aériennes avec un zoom sur les alvéoles. 33

Figure 16 : Représentation de l'organisation des différentes populations cellulaires de l'épithélium des voies aériennes.. 33

Figure 17 : Les différents types cellulaires épithéliaux des voies aériennes.. 34

Figure 18 : L'épithélium alvéolaire..... 37

Figure 19 : Liquide de surface des voies aériennes 38

Figure 20 : Le VEMS reflète la sévérité de l'atteinte respiratoire..... 39

Figure 21 : Représentation des bactéries cliniquement importantes dans la mucoviscidose par classes d'âges en France..... 40

Figure 22 : L'inflammation dans la mucoviscidose. 44

Figure 23 : Altération des voies respiratoires et formations de pièges extracellulaires neutrophiles (NET) dans les voies respiratoires CF..... 46

Figure 24 : Schéma des deux voies de signalisation NF-κB. 52

Figure 25 : Stratégies thérapeutiques pour la prise en charge de l'atteinte respiratoire des patients atteints de mucoviscidose..... 59

Figure 26 : Traitements améliorant la clairance mucociliaire 60

Figure 27 : Traitements anti-infectieux. 60

Figure 28 : Traitements anti-inflammatoires..... 61

Figure 29 : Représentation schématique des stratégies thérapeutiques qui sont développées pour la mucoviscidose. 63

Figure 30 : Localisation des gènes de miARN dans le génome 71

Figure 31 : Biosynthèse des miARN. 72

Figure 32 : Mécanisme d'action des miARN : le complexe miRISC altère la traduction de l'ARNm et entraîne une déstabilisation de l'ARNm par déadénylation et/ou inhibition de la traduction (Bardin et al., 2018b). 74

Figure 33 : Schéma représentant les différentes approches pour inhiber ou mimer un miARN. 78

Figure 34 : Schéma représentant les ARN parmi les formes extracellulaires. 86

Figure 35 : Résultats complémentaires de l'article sur miR-199a-3p. 115

Figure 36 : Comparaison de l'expression de miR-199a-3p entre des cellules non-CF et CF en conditions basales. 116

Figure 37 : Validation de l'expression de deux miARN dont l'expression ne varie pas dans le *small RNAseq*. 116

Figure 38 : Impact de la surexpression de miR-199a-3p sur d'autres cibles prédites. 117

Figure 39 : Effet du miR-199a-3p sur l'expression en ARNm de l'*IL-8*..... 118

Figure 40 : Expression basale des gènes synthétisant le miR-199a-3p. 119

Figure 41 : Comparaison de l'expression basale de miR-199a-5p entre des cellules non-CF (16HBE14o-) et CF (CFBE41o-)..... 119

Figure 42 : Expression protéique d'IKKβ dans des cellules CF (CFBE41o-) après la transfection d'un antagomiR-199a-3p ou d'un antagomiR contrôle (30 nM) pendant 24 h. 119

Figure 43 : Effets d'une stimulation pro-inflammatoire sur l'expression de miR-199a-3p. 124

Figure 44 : Effet d'une surexpression de miR-199a-3p puis d'une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β ± TNF-α) pendant 48 h sur l'expression de miR-199a-3p et l'activation de la voie NF-κB..... 125

Figure 45 : Conséquence d'une stimulation anti-inflammatoire sur l'expression de miR-199a-3p. 126

Figure 46 : Effet de l'inhibiteur 172 et de la combinaison Vx-809/Vx-770 sur l'activité chlorure liée à CFTR dans des cellules épithéliales CF. 127

Figure 47 : Effet d'une modulation de l'activité de CFTR sur l'expression de miR-199a-3p. 128

Figure 48 : Effet de la ionomycine et de la thapsigargine sur la modulation de la $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$ dans des cellules épithéliales non-CF. 129

Figure 49 : Effet d'une modulation calcique sur l'expression de miR-199a-3p et les gènes qui le synthétisent. 131

Figure 50 : Effet d'une infection par *Pseudomonas aeruginosa* sur l'expression de miR-199a-3p. 132

Figure 51 : Etude de la liaison du miR-9-5p au 3'-UTR de *NFKB1*. 136

Figure 52 : Effet de la transfection d'un mimic de miR-199a-3p, miR-636 ou miR-9-5p sur l'expression des deux autres. 137

Figure 53 : Effet de la surexpression de miR-9-5p sur l'expression de la dynamine 3, gène incluant le miR-199a-3p. 138

Figure 54 : Effet de la transfection d'un mimic de miR-199a-3p, miR-636 ou miR-9-5p sur l'expression de miR-144.. 139

Figure 55 : Effet des transfections et co-transfection d'un mimic de miR-199a-3p, miR-636 et miR-9-5p sur l'activité de NF-κB et la sécrétion en IL-8, IL6. 140

Figure 56 : Expression de miR-199a-3p, miR-636 et miR-9-5p dans les plasmas CF et non-CF. 170

Figure 57 : Expression de miR-199a-3p, miR-636 et miR-9-5p dans les neutrophiles CF et non-CF. 171

Figure 58 : Résultats du *RNAseq*. 174

Figure 59 : Analyse en composantes principales des données issues du *small RNAseq*. 177

Figure 60 : Exemple de réseau de co-régulation de miARN-miARN. 188

Figure 61 : Lien entre les miR-199a-3p, 636 et 9 dans des cellules CF 189

II. Liste des tableaux

Tableau 1 : Interprétation des résultats en fonction du dosage de la sueur 27

Tableau 2 : Comparaison des diabètes de type 1 et 2 au diabète associé à la mucoviscidose. 30

Tableau 3 : Voies de signalisation altérées dans la mucoviscidose et gènes associés 50

Tableau 4 : Traitements anti-inflammatoires évalués ou utilisés chez les patients atteints de mucoviscidose..... 62

Tableau 5 : Etudes cliniques sur les modulateurs de CFTR chez les patients atteints de mucoviscidose 66

Tableau 6 : Comparaison des miARN et des siARN. 70

Tableau 7 : Tableau représentant les miARN dérégulés liés directement ou indirectement à CFTR dans le contexte de la mucoviscidose. 81

Tableau 8 : Tableau représentant les miARN dérégulés ciblant d'autres cibles que CFTR dans le contexte de la mucoviscidose. 85

Tableau 9 : Caractérisation des miARN présents dans 12 fluides biologiques. 87

Tableau 10 : Tableau représentant les séquences des mimic spécifiques des trois miARN utilisés pour ce projet (miR-199a-3p, miR-636, miR-9-5p). 134

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des miARN prédits pour cibler les gènes de la dynamine 2 et 3, qui synthétisent le miR-199a-3p d'après différentes bases de données. 138

Tableau 12 : Résultats du *RNAseq* : liste des 27 gènes différentiellement exprimés dans les cellules CF ± Vx-809/Vx-770. 175

Tableau 13 : Répartition des 27 gènes différentiellement exprimés en fonction de leur rôle. 176

Tableau 14 : Tableau représentant les cibles et rôles de miR-199a-3p dans différents contextes pathologiques de 2008 à 2019 183

III. Liste des abréviations

A	AAV	*Adeno Associated Virus*
	ABC	*ATP-Binding Cassette*
	ABCC7	*ATP-Binding Cassette sub-family C member 7*
	ADAR	*Adenosine Deaminase Acting on RNA*
	ADN	Acide DésoxyriboNucléique
	Ago	Argonaute
	ALI	*Air-Liquid Interface*
	ALX/FPR2	*Lipoxin A4 Receptor/Formyl-Peptide Receptor type 2*
	AMPc	*Adenosine MonoPhosphate cyclique*
	ANO1	Anoctamine 1
	ANT2	*Adenine Nucleotide Translocator 2*
	AntagomiR	Agoniste de miARN ou antimiR
	AP-1	*Activator Protein 1*
	ARE	Eléments riche en AU
	ARN	Acide RiboNucléique
	ARNi	ARN interférent
	ARNlnc	ARN long non codant
	ARNm	ARN messager
	ASL	Liquide de Surface des voies Aériennes
	ASO	*Anti-Sens Oligonucleotid*
	ATF6	*Activating Transcription Factor 6*
	ATG	*AuTophaGy related*
	ATP	*Adenosine-5'-TriPhosphate*
	ATP12A	*ATPase H^+/K^+ transporting non-gastric Alpha 2 subunit*
	ATPase/SERCA	*Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} - ATPase*
B	BAPTA-AM	*1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N, N, N, N'-tetraacetic acid-AcetoMethyl*
	BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
C	Ca^{2+}	Ion Calcium
	CaCC	*Calcium-activated Chloride Channel*
	CAV1	CAVéoline 1
	CC10	*Club Cell 10 kDa*
	CCL	Chimiokine
	CEBPB	*CCAAT Enhancer Bindind Protein Beta*

	ceRNA	*competing endognous RNA*
	CF	*Cystic Fibrosis*
	CFBD	*CF-related Bone Disease*
	CFBE	Cellules épithéliales bronchiques humaines CF
	CFF	*Cystic Fibrosis Fundation*
	CFLD	*Cystic Fibrosis Liver Disease*
	CFRD	*Cystic Fibrosis Related Diabetes*
	CFTR	*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*
	CFTR 1	*Cystic Fibrosis Mutation Databse*
	CFTR 2	*Clinical and Functionnal Translation of CFTR*
	CH_3COO^-	Ethanoate
	Cl^-	Ion Chlorure
	CpAg	Cellule présentatrice de l'Antigène
	CRCM	Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose
	CREB	*c-AMP Response Element-Binding protein*
	CRISPR-Cas9	*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/associated protein 9*)
	CXC	Chimiokine
	CXCR1	*C-X-C motif chemokine Receptor 1*
	CMV	CytoMégaloVirus
D	DCP1/DCP2	*DeCaPping complex 1/2*
	DDP	Différence de potentiel transépithélial
	DGCR8	*DiGeorge syndrome Critical Region gene 8*
	DSB	*Double-Stranded Break*
	DTT	*DiThioThréitol*
E	ECBC	Examen CytoBactériologique des Crachats
	EGF	*Epidermal Growth Factor*
	EIF	*Eukaryotic Initiation Factor*
	ELISA	*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
	EMA	*European Medicines Agency*
	ENaC	*Epithelial Na^+ Channel*
	EOR	*EROverload Response*
	ERAD	*ER-Associated Degradation*
	ERK	*Extracellular signal-Regulated Kinase*
F	F^-	Ion Fluorure
	F508del	Délétion de la phénylalanine en position 508
	FAM13A	*FAMily with sequence similarity 13 member A*

	FDA	*Food and Drug Administration*
G	GM-CSF	*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*
	GO	*Gene Ontology*
	GRα	*Glucocorticoid Receptor alpha*
	GSH	Glutathion réduit
	GWAS	*Genome Wide Association Study*
H	HCC	Carcinome hépatocellulaire
	$HCCO^-$	Méthanoate
	HCO_3^-	Bicarbonate
	HCV	Virus de l'Hépatite C
	HGF	*Hepatocyte Growth Factor*
	HMGB1	*High Mobility Group Box 1*
	HRP	*Horse Radish Peroxidase*
	HSP90	*Heat Shock Protein 90*
I	I^-	Ion Iodure
	ICAM-1	*InterCellular Adhesion Molecule 1*
	IFN	Interferon
	IKK	*Inhibitor of nuclear factor Kappa B Kinase*
	IL	Interleukine
	IL1R1	*Interleukin 1 Receptor Type 1*
	Inh172	Inhibiteur 172
	IPLV	Intolérance aux Protéines du Lait de Vache
	IRF3	*Interferon Regulatory Factor 3*
	IVT	*In Vitro Transcribed*
J	JNK	*c-Jun NH2-terminal Kinase*
K	kb	kilobase
	kDa	kiloDalton
	KSRP	*Kh-type Splicing Regulatory Protein*
L	LBA	Lavage Broncho-Alvéolaire
	LNA	*Locked Nucleic Acid*
	LPS	*LipoPolySaccharide*
M	M7G	7-méthyl-guanosine
	MAPK	*Mitogen Activated Protein Kinase*
	MBL2	*Mannose Binding Lectin 2*
	MEC	Matrice ExtraCellulaire

	miARN	microARN
	MMP	Métalloprotéase matricielle
	MOI	*Multiplicity Of Infection*
	MRE	*microRNA Response Element*
	MSD	*Membrane-Spanning Domain*
	mTOR	*mechanistic Target Of Rapamycin Kinase*
	MUC	MUCine
N	n	nombre d'échantillons
	Na^+	Ion Sodium
	NBD	*Nucleotide Binding Domain*
	NEMO	*NF-κB Essential MOdulator*
	NET	*Neutrophil Extracellular Trap*
	NF-κB	*Nuclear Factor-kappa B ou REL/NF-κB*
	NGS	*Next-Generation Sequencing*
	NKCC1	*Na^+-K^+-2Cl^- cotransporter protein 1*
	NO_3^-	Nitrate
	NORAD	*NOncoding RNA activated by DNA Damage*
O	O_2	Dioxygène
	ORCC	*Outwardly Rectifying Chloride Channel*
	ORF	*Open Reading Frame*
P	*P. aeruginosa*	*Pseudomonas aeruginosa*
	PACT	*Protein ACTivator of the interferon-induced protein kinase*
	PAF	*Platelet Activating Factor*
	PAK	Souche de *Pseudomonas aeruginosa*
	PAMPs	*Pathogen-Associated Molecular Patterns*
	PAO1	Souche de *Pseudomonas aeruginosa*
	PI3K	Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase
	PIP_2	Phosphatidyl-Inositol diPhosphates
	PIP_3	Phosphatidyl-Inositol triPhosphates
	PK	Protéine Kinase
	PNA	*Peptide Nucleic Acid*
	PNN	PolyNucléaire Neutrophile
	Pol II	Polymérase II
	PPase	Phosphatase
	PRR	*Pattern-Recognition Receptors*
	PRSS1	*Serine Protease 1*

	pS	picoSiemens
	PTEN	*Phosphatase and TENsin homolog*
R	R	domaine Régulateur
	RAB17	*Ras-related protein Rab-17*
	RAGE	*Receptor for Advanced Glycation Endproducts*
	RANTES	*Regulated upon Activation Normal T cells Expressed and Secreted*
	RE	Réticulum Endoplasmique
	RHD	*Rel Homology Domain*
	RISC	*RNA-Induced Silencing Complex*
	ROMK	*Renal Outer Medullary Potassium channel*
	ROS	Espèce réactive de l'oxygène
	RPTOR	*Regulatory-associated Protein of mTOR complex 1*
	RT-qPCR	*Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction*
S	SCID	*Severe Combined ImmunoDeficiency*
	SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
	SEAP	*Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase*
	SERCA	*Sarco/Endoplasmic Reticulum* Ca^{2+}
	siARN	*small interfering RNA*
	SHIP1	*SH-2 containing Inositol 5' Polyphosphatase 1*
	SIN3	*SIN3 transcription regulatory family member A*
	SLC	*Solute Carrier family*
	SII	Système Immunitaire Inné
	SNHG1	*Small Nucleolar RNA Host Gene 1*
	SNP	*Single Nucleotide Polymorphism*
	SP	*Surfactant Protein*
	SP1	*Specificity Protein 1*
	SSO	*Splice-Switching Oligonucleotide*
T	TALENs	*TAL-Effector Nucleases*
	TARS	*Threonyl-tRNA Synthetase*
	TGF-β1	*Transforming Growth Factor beta 1*
	TIR	Trypsine ImmunoRéactive
	TLR	*Toll-Like Receptor*
	TMD	*TransMembrane Domains*
	TNF	*Tumor Necrosis Factor*
	TNFRSF11A	*TNF Receptor Superfamily Member 11a* ou RANK
	TRBP	*TAR-Binding Protein*

	TREM1	*Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1*
	TRIF	*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*
	TSB	*Target Site Blocker*
	TTP	*TrisTetraPoline*
	TYRP1	*TYrosinase-Related Protein 1*
U	UPR	*Unfolded Protein Response*
	UTR	*UnTranslated Region*
V	VA	Voies Aériennes
	VIP	*Vasoactive Intestinal Peptide*
	Vx-445	Elexacaftor
	Vx-445 / 661 / 770	Symdeko®
	Vx-661	Tezacaftor
	Vx-770	Ivacaftor ou Kalydéco®
	Vx-809	Lumacaftor
	Vx-809 / 770	Orkambi®
	VEMS	Volume Expiratoire Maximal par Seconde
Z	ZFN	*Zinc Finger Nuclease*

AVANT-PROPOS

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies monogéniques rares à transmission autosomique récessive rencontrée dans les populations d'origine caucasienne. Elle touche plus de 75 000 personnes dans le monde dont plus de 7 000 en France. Cette pathologie se développe dès la naissance pour la plupart des patients puis devient chronique et handicapante, jusqu'à engager le pronostic vital des patients. En 1989, le gène *CFTR* responsable de cette pathologie a été découvert et depuis des progrès ont été réalisés en recherche fondamentale et clinique permettant une meilleure compréhension de cette maladie, une amélioration de la qualité de vie des patients et l'orientation de la recherche vers des thérapies curatives. Les mutations de *CFTR* induisent de nombreuses conséquences physiopathologiques au niveau systémique, mais aussi au niveau pulmonaire. Cette dernière est caractérisée par des cycles d'inflammation et d'infection broncho-pulmonaire chroniques qui sont la cause majeure de morbidité et de mortalité des patients atteints de mucoviscidose.

Malgré l'amélioration de l'espérance de vie, de 5 ans dans les années 60 à plus de 50 ans aujourd'hui, la majorité des patients atteints de mucoviscidose meurent toujours d'insuffisance pulmonaire. Ralentir la progression de l'atteinte pulmonaire est donc un axe majeur de la prise en charge de la mucoviscidose. Les traitements reçus dans ce cadre sont nombreux et visent les différentes composantes de l'atteinte. Ils sont classés en deux catégories : les traitements curatifs et les traitements symptomatiques. Les traitements visant à restaurer CFTR ont émergé ces dernières années mais l'efficacité prouvée se limite seulement à quelques mutations contre plus de 2 000 mutations existantes de ce gène. Parmi les traitements symptomatiques, on retrouve les anti-inflammatoires.

L'inflammation chez les patients atteints de mucoviscidose est précoce, persistante et excessive en réponse à la charge bactérienne et est responsable d'une dégradation progressive de l'épithélium pulmonaire. Les traitements anti-inflammatoires représentent donc une partie importante du traitement des patients. Parmi les traitements anti-inflammatoires on retrouve l'ibuprofène, les antibiotiques aux actions anti-inflammatoires et les corticostéroïdes. Le premier peut provoquer des douleurs abdominales, des saignements nasaux et des conjonctivites, les seconds ne peuvent pas être utilisés en continu et les derniers peuvent provoquer un retard de croissance, une dysphonie, du diabète, une hyperglycémie et une cataracte. Les effets secondaires provoqués par l'administration de ces molécules semblent être liés à des actions non spécifiques et non ciblées qui aggravent le tableau clinique des patients.

Le nombre important de patients, la gravité de la maladie et l'importance des coûts engendrés par les traitements qui ne sont pas ciblés et pour un spectre faible de patients, font de la mucoviscidose un enjeu de santé publique. Une meilleure compréhension des processus de régulation de l'inflammation et la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques représentent un intérêt majeur pour l'amélioration des traitements.

INTRODUCTION

I. La mucoviscidose

1. Epidémiologie

La mucoviscidose ou fibrose kystique (CF pour *Cystic Fibrosis*) est la plus commune des maladies monogéniques rares à transmission autosomale récessive. Elle touche principalement la population d'origine caucasienne avec plus de 75 000 malades dans le monde d'après la *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF) et 7 114 malades en France d'après le registre français de la mucoviscidose de 2017 (https://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/rapport_du_registre_-_donnees_2017.pdf), qui est le second pays d'Europe après le Royaume-Uni qui recense le plus de patients atteints de mucoviscidose (figures 1 et 2).

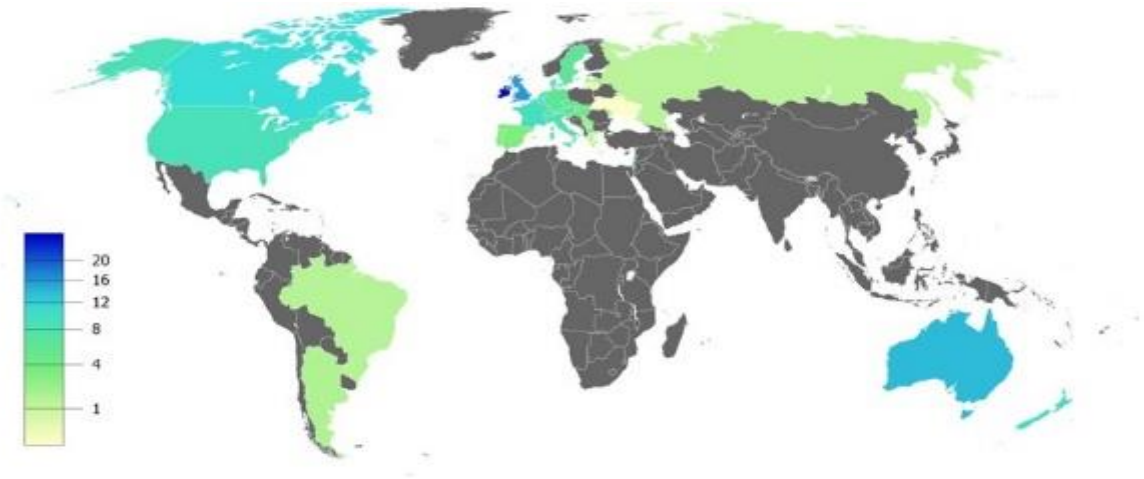


Figure 1 : Prévalence de la mucoviscidose pour 100 000 habitants dans le monde (Lopes-Pacheco, 2016).

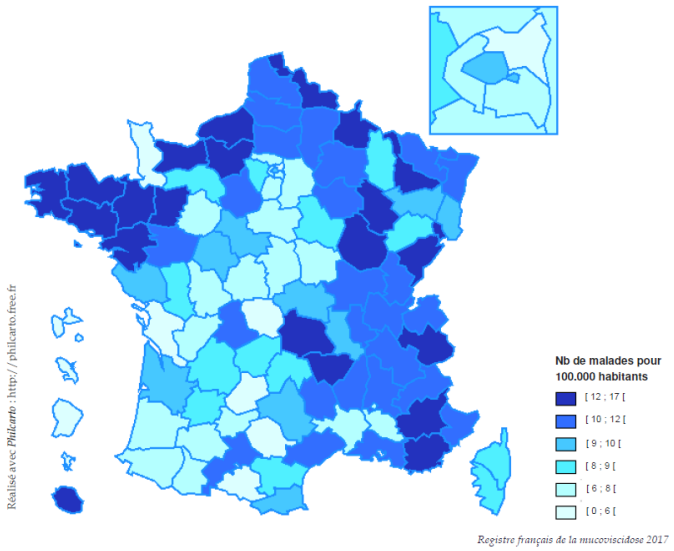


Figure 2 : Prévalence de la mucoviscidose pour 100 000 habitants en France (registre français de la mucoviscidose – bilan des données 2017).

L'incidence de la mucoviscidose est très variable selon les origines ethniques. Alors que l'incidence à la naissance est d'un nouveau-né sur 2 500 naissances dans les populations d'origine caucasienne (1 / 4 300 en France), elle n'est par exemple que de 1 / 32 400 dans les populations d'origine asiatique, de 1 / 20 000 dans les populations noires américaines/africaines, de 1 / 8 500 dans les populations hispaniques et de 1 / 4 400 au Moyen-Orient (O'Sullivan and Freedman, 2009) (figure 3). L'incidence varie également fortement en fonction des régions, la Bretagne (1 / 2 500) et plusieurs départements de l'est de la France présentent par exemple une prévalence pour la mucoviscidose supérieure à la moyenne des autres régions en France (Girodon-Boulandet and Costa, 2005).

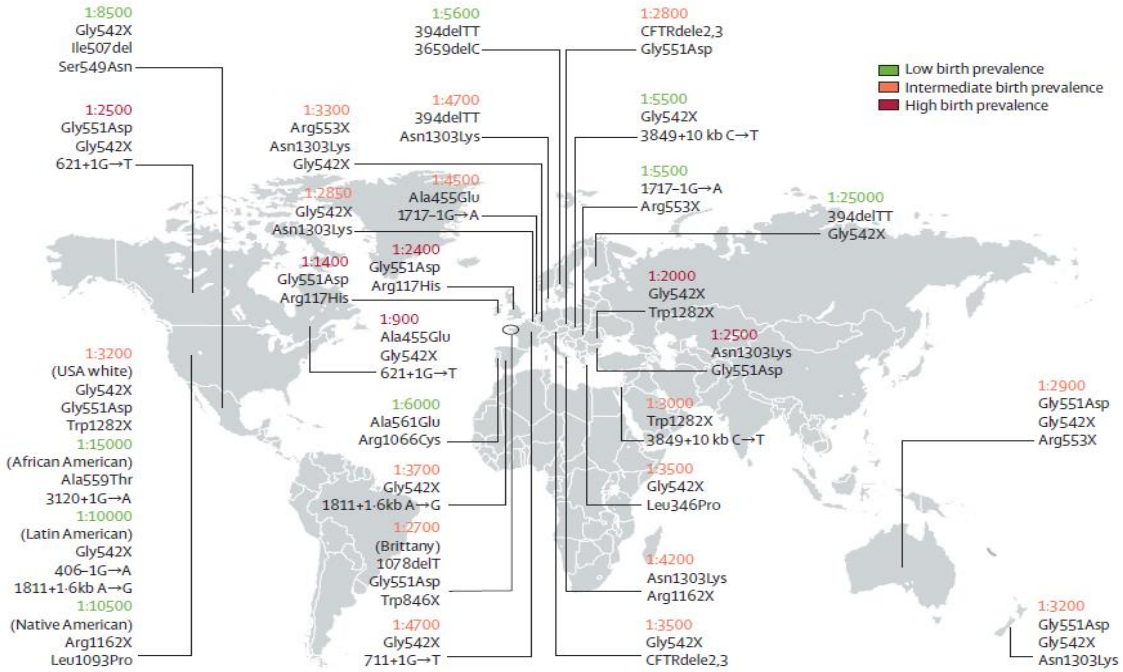


Figure 3 : Prévalence des naissances CF et des mutations les plus communes pour une sélection de pays (O'Sullivan and Freedman, 2009).

En France, une personne sur 35 est porteuse saine d'une mutation du gène impliqué dans la mucoviscidose et en 2017, sur les nouveaux-nés vus cette même année, 111 étaient atteints de mucoviscidose. Les hommes et les femmes sont atteints avec la même fréquence par la maladie (registre français de la mucoviscidose – bilan des données 2017) (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 la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose.

2. Historique

Même si la découverte du gène responsable est récente, cette pathologie est connue depuis longtemps et des preuves indirectes suggèrent que cette mutation était présente en Bretagne il y a plus de 3 000 ans (Farrel et al., 2007). Les premiers écrits faisant état de la maladie remontent au Moyen-Age, et rapportent des témoignages d'enfants « ensorcelés aux baisers salés » (O'Connor et al., 2002).

L'une des premières descriptions médicales des lésions pancréatiques rencontrées dans la mucoviscidose pourrait dater de 1595 (Busch, 1990). Un rapport d'autopsie fait par le professeur Pieter Pauw (1564-1617) aux Pays-Bas datant de 1595, décrit une patiente âgée de 11 ans supposée ensorcelée et présentant un pancréas élargi, dur et blanc. En 1905, l'iléus méconial est décrit comme étant une atteinte digestive présente chez certains enfants atteints de mucoviscidose (Landsteiner, 1905).

Au début du XXème siècle, les premières observations associant l'atteinte pulmonaire, les diarrhées et les anomalies pancréatiques apparaissent à travers plusieurs cas d'enfants de la même famille (Garrod and Hurley, 1912). Guido Fanconi (1892-1979) décrit cette maladie, comme une maladie cœliaque portant le nom de « fibrose kystique du pancréas et bronchectasie ». Cependant ce n'est que deux ans plus tard que la mucoviscidose a été considérée comme une maladie à part entière notamment par la pédiatre américaine Dorothy Hansine Andersen (1901-1963) qui publia un article décrivant les caractéristiques cliniques de la mucoviscidose telles que l'obstruction intestinale néonatale, les complications respiratoires et digestives et les lésions histologiques spécifiques du pancréas (Andersen, 1938). Afin de corriger la dénomination employée par Dorothy Hansine Andersen, centrée sur le pancréas « fibrose kystique du pancréas et ses relations avec la maladie cœliaque », la docteure Sidney Farber (1903-1976) employa le terme « mucoviscidosis » créé à partir des termes « mucus » et « visqueux » (Farber, 1943).

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

Les anomalies électrolytiques sont par la suite découvertes et décrites par le docteur Paul Di Sant' Agnese (1914-2005), dans la sueur des patients atteints de mucoviscidose. Elles sont caractérisées par une élévation importante des ions chlorure (Cl^-) et sodium (Na^+) permettant ainsi d'envisager le diagnostic de la maladie par un test de la sueur (Di Sant'Agnese, 1953).

En 1981, le potentiel électrique au niveau de la muqueuse nasale des patients atteints de mucoviscidose est plus électronégatif que chez les sujets sains de part une réabsorption massive de sodium entraînant une déshydratation du liquide de surface de l'épithélium (Knowles et al., 1981). Cette découverte a permis de faire un lien physiologique entre les poumons, le pancréas et les glandes sudoripares.

Mais ce n'est qu'en 1989, que le gène à l'origine de la maladie est isolé et séquencé par les équipes de Tsui, Collins et Riordan (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989).

Les patients atteints de mucoviscidose portent une mutation sur le gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) localisé sur le chromosome 7 et codant pour une protéine transmembranaire. La fonction de canal chlorure de cette protéine CFTR fut par la suite identifiée par Anderson, permettant d'envisager des thérapies géniques (Anderson et al., 1991).

3. Gène et protéine CFTR

Plus de 2 000 mutations du gène *CFTR* sont à ce jour référencées, dont la plus fréquente est la mutation homozygote F508del (délétion de la phénylalanine en position 508). CFTR est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des protéines ABC (*Adenosine-5'-TriPhosphate Binding Cassette*), transporteurs transmembranaires utilisant l'ATP (*Adenosine-5'-TriPhosphate)* comme source d'énergie. CFTR est exprimée au pôle apical des épithélia sécréteurs, permettant l'efflux d'ions chlorures depuis la cellule vers la lumière. Au niveau pulmonaire, elle contribue ainsi activement au maintien de l'équilibre osmotique et plus particulièrement à l'hydratation du mucus.

1) Gène *CFTR*

Le gène *CFTR* est localisé sur le bras long du chromosome 7 en position 7q31.2 et est composé de ~ 190 kb (kilobases) formant 27 exons à l'origine de la synthèse d'un ARNm (Acide RiboNucléique messager) de 6,5 kb (figure 4) (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rowntree and Harris, 2003). Les mutations du gène *CFTR* sont à l'origine de la mucoviscidose.

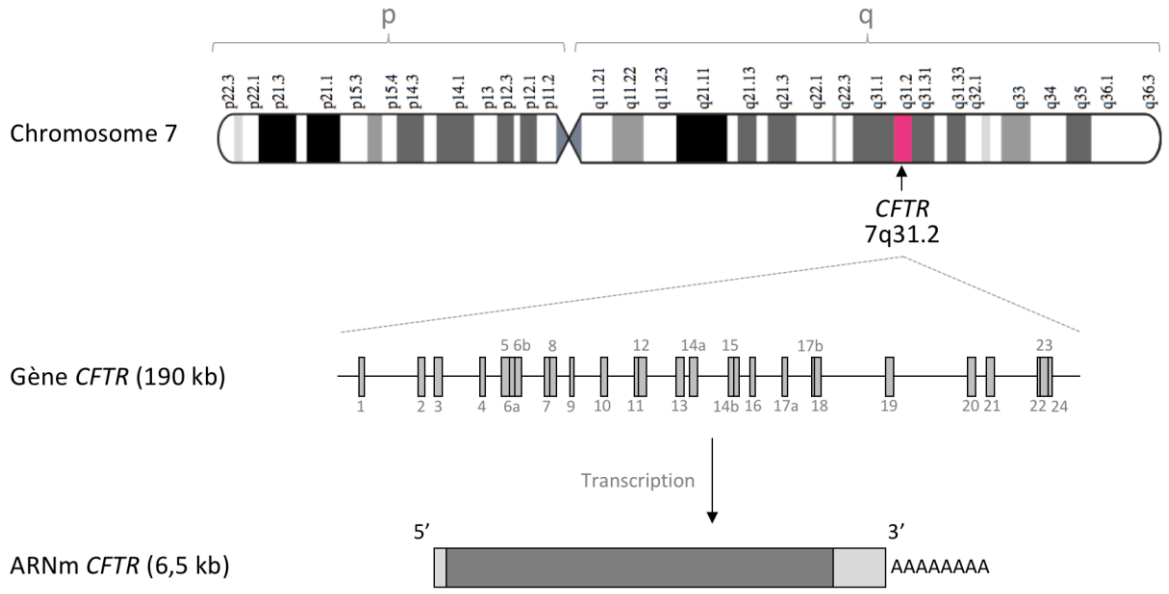


Figure 4 : Du gène *CFTR* à l'ARNm. Localisation du gène *CFTR* sur le chromosome 7 humain, représentation des exons (rectangles gris sur le gène *CFTR*) et ARNm de *CFTR* (Rowntree and Harris, 2003).

2) Protéine CFTR

Le gène *CFTR* code pour une glycoprotéine transmembranaire du même nom de 168 kDa (kiloDaltons) constituée de 1 480 acides aminés (Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989). La protéine CFTR appartient à la famille des transporteurs ABC et est aussi connue sous le nom d'ABCC7 pour *ATP-Binding Cassette sub-family C member 7*. Les transporteurs de la famille ABC représentent l'une des plus grandes familles de protéines et restent conservés entre les différents règnes du vivant. Leur rôle principal est le transport actif de nombreux substrats (acides aminés, peptides, protéines, lipides, ions, toxines…), permettant de réguler la balance électrolytique et hydrique des membranes plasmiques et intracellulaires par hydrolyse d'une molécule d'ATP (Gadsby et al., 2006; Gentzsch et al., 2010; Gustafsson et al., 2012).

Le modèle théorique du canal a été obtenu par modélisation moléculaire en utilisant des modèles expérimentaux de protéines homologues appartenant à la famille des transporteurs ABC (figure 5). La structure tridimensionnelle de la protéine montre une portion constituée de motifs en hélice et correspondant aux domaines transmembranaires (MSD1 et MSD2 – *Membrane-Spanning Domain* ou également appelé TMD - *TransMembrane Domains*). Ils sont surmontés par deux domaines intracellulaires capables de se lier à l'ATP, appelés NBD1 et NBD2 (*Nucleotide Binding Domain*). Enfin, une région régulatrice (R) leur est juxtaposée.

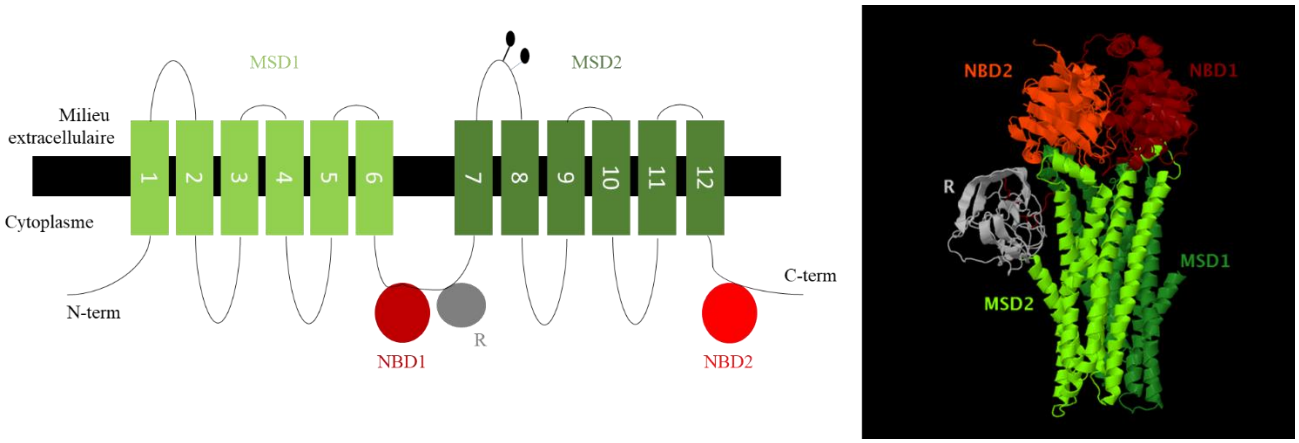


Figure 5 : Schéma montrant l'organisation transmembranaire des différents domaines de la protéine CFTR et le modèle théorique de la protéine CFTR humaine basée sur l'homologie avec Sav1866 (Kim and Skach, 2012) (à gauche). Organisation structurelle de la protéine CFTR (librairiedemolecules.education.fr) (à droite).

L'étendue des domaines est la suivante : 81-350 : MSD1, 433-584 : NBD1, 860-1149 : MSD2, 1219-1382 : NBD2, le domaine R n'est quant à lui pas identifié mais il s'étend entre les résidus 590-831 (*CFTR1 database*, http://www.genet.sickkids.on.ca/Home.html).

Les domaines MSD1 et MSD2 comprennent chacun six hélices α hydrophobes contribuant à la formation du canal, à la sélectivité anionique et à sa faible conductance. Dix des douze hélices α contiennent un ou plusieurs acides aminés chargés positivement, favorisant le passage d'ions chargés négativement. Les hélices 7 et 8 sont quant à elles, le siège de modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation (figure 5).

Les domaines hydrophiles de liaisons aux nucléotides, NBD1 et NBD2, sont formés d'un feuillet β entouré d'hélices α et contenant des séquences consensus de liaison à l'ATP. Ces domaines participent ainsi à la régulation des mécanismes ATP-dépendants d'ouverture et de fermeture du canal.

Enfin le domaine de régulation R, cytoplasmique, permet de relier les deux séquences répétées MSD-NBD. Il est spécifique de CFTR et contient de nombreux résidus chargés et les principaux sites potentiels de phosphorylation par les PKA et PKC (Protéines Kinases A et C) (Chappe et al., 2003; Riordan et al., 1989).

3) Localisation de CFTR

L'expression de la protéine CFTR est ubiquitaire (figure 6). Elle est retrouvée au niveau des membranes apicales des cellules épithéliales des organes à glandes exocrines tels que le pancréas, les glandes salivaires, les poumons, le foie, les intestins, la peau et les appareils génitaux (Crawford et al., 1991). En fonction de ces différents tissus, elle ne sera pas exprimée de la même manière. En effet, dans l'épithélium des glandes salivaires et pancréatiques elle est fortement exprimée alors qu'elle l'est moins au niveau pulmonaire (Kreda et al., 2005).

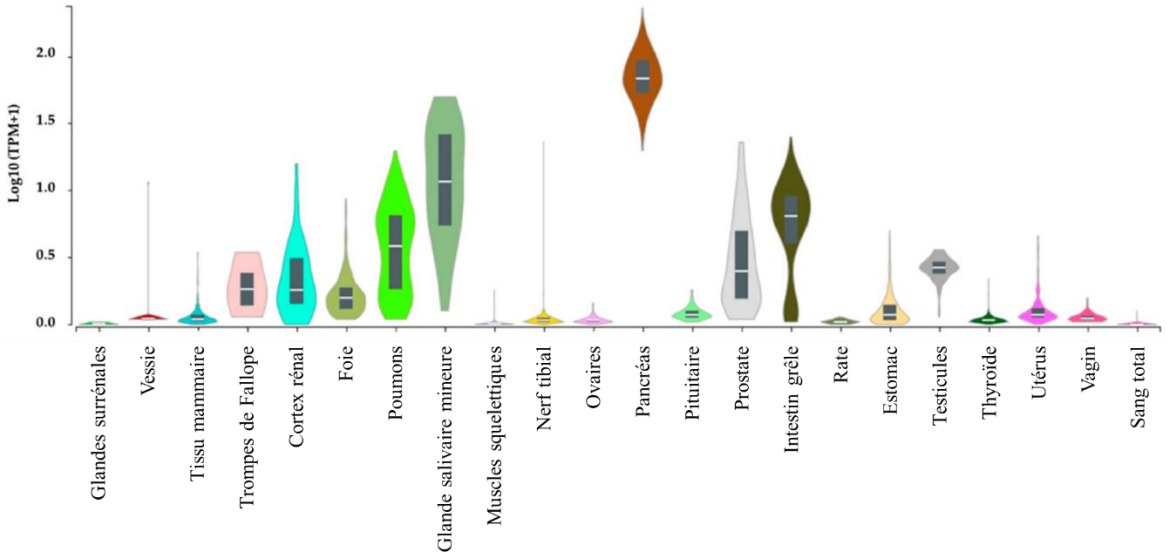


Figure 6 : Expression globale de *CFTR* humain (Ideozu et al., 2019).

Au niveau pulmonaire, la protéine CFTR est majoritairement présente au niveau de l'épithélium de surface des voies aériennes et notamment à la face apicale des cellules ciliées (figure 7) et des glandes sous-muqueuses (Jacquot et al., 1993).

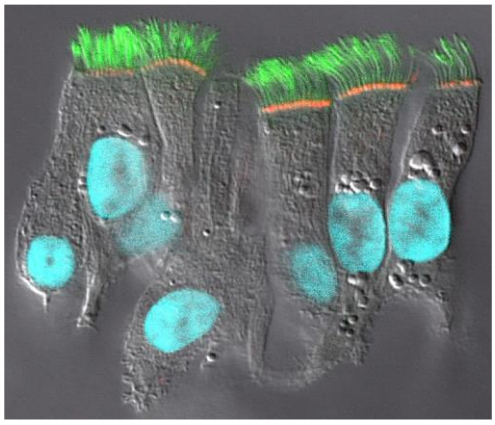


Figure 7 : Immunomarquage du canal CFTR au niveau apical de la membrane d'une cellule ciliée bronchique (CFTR : rouge, cils : vert-tubuline b, noyaux : bleu-DAPI) (Kreda et al., 2005).

4) Fonction de CFTR

a. Canal à ions chlorures

Le canal CFTR est sensible à l'AMPc (*Adenosine MonoPhosphate cyclique*) et sa principale fonction est de permettre le passage des ions Cl^- de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule (Anderson et al., 1991). La conductance aux ions Cl^- associée au canal CFTR présente des caractéristiques spécifiques, notamment aux anions. Sa séquence de perméabilité : $Br^- > Cl^- > I^- > F^-$, se distingue de celles des autres canaux Cl^- épithéliaux dans lesquelles l'I^- (iodure) est plus perméable que le Cl^- (Anderson et al., 1991). La conductance du canal a par la suite été évaluée entre 6-11 pS (picoSiemens) en fonction du type cellulaire, de la température et de la concentration ionique (Sheppard and Welsh, 1999).

b. Transporteurs

Même si la principale fonction du canal CFTR est celle d'un canal Cl^-, il n'en reste pas moins qu'il est aussi capable de transporter d'autres molécules, telles que des anions polyatomiques : le nitrate (NO_3^-), le bicarbonate (HCO_3^-), le méthanoate ($HCCO^-$) et l'éthanoate (CH_3COO^-) (Linsdell et al., 1997), et du glutathion réduit (GSH).

Le GSH est un tripeptide ubiquitaire des cellules eucaryotes, contribuant à protéger l'organisme des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Linsdell and Hanrahan, 1998). Le flux de GSH à travers le canal CFTR est une propriété intrinsèque à celui-ci, aussi des anomalies du transport du glutathion seraient directement liées aux mutations du gène *CFTR* (Kogan et al., 2003).

c. Régulateur d'autres canaux

En 1986, avant même la découverte du canal CFTR, une hyperabsorption de Na^+ avait été observée dans des cellules épithéliales CF (Boucher et al., 1986). Le canal sodique ENaC (*Epithelial Na^+ Channel*) responsable de ces efflux est régulé négativement par le canal CFTR (figure 8) (Gentzsch et al., 2010; Kunzelmann et al., 1995; Mall et al., 1998). Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'absence ou la déficience du canal CFTR va entraîner une levée de l'inhibition de la fonction du canal ENaC, provoquant alors un influx accru de Na^+ de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, entraînant un déséquilibre osmotique, qui aboutit à une déshydratation du liquide de surface des voies aériennes. Ce mécanisme a ensuite été confirmé chez des souris sur-exprimant la sous-unité β du canal ENaC (il en existe trois : α, β, γ) dans les poumons, qui présentaient une déshydratation et une obstruction des voies aériennes par le mucus (Mall et al., 2004). De manière controversée, quelques études ont montré qu'une perte de l'activité de CFTR entraînait une diminution de la conductance de Cl^- sans augmenter l'absorption de Na^+ dans les épithélia CF (Chen et al., 2010; Itani et al., 2011).

Le canal CFTR est requis pour l'activation du canal ORCC (*Outwardly Rectifying Chloride Channel*), canal Cl^- dépendant de l'AMPc, par la PKA ou l'ATP (figure 8) (Gabriel et al., 1993).

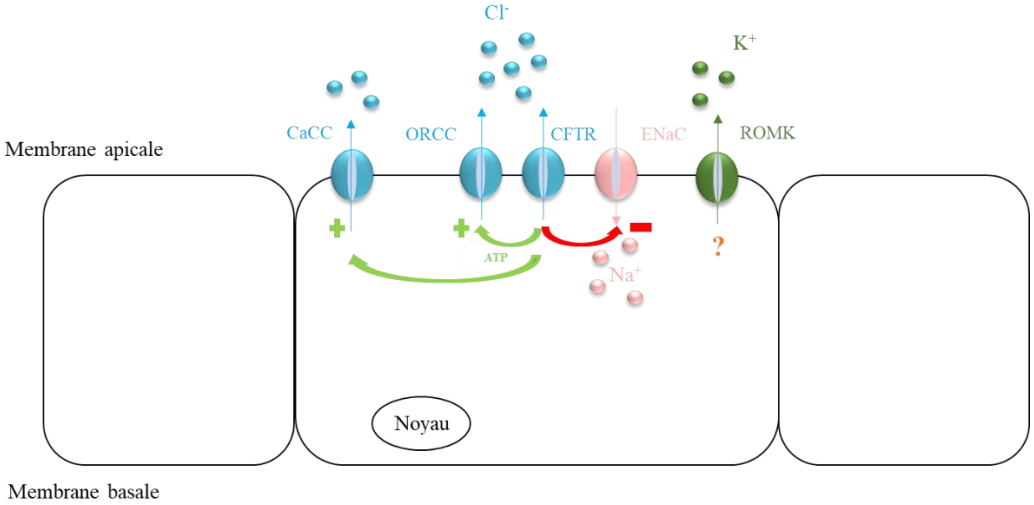


Figure 8 : Régulation des canaux CaCC, ORCC, ENaC et ROMK par CFTR.

Le canal ROMK (*Renal Outer Medullary Potassium*), principalement localisé au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales rénales serait également régulé par CFTR (Morales et al., 1996) (figure 8).

En 1997, il a été suggéré que le canal CFTR régulait l'activité d'autres canaux tels que les CaCC (*Calcium (Ca^{2+})-activated Chloride Channel*) (figure 8) et les échangeurs Cl^-/HCO_3^- (Kunzelmann et al., 1997; Seidler et al., 1997).

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

d. Régulation de CFTR

Au repos, le canal CFTR est inactif, fermé et empêche la sortie des ions Cl^-. L'activation du canal CFTR a lieu lors de la phosphorylation du domaine R et la liaison de molécule d'ATP au domaine NBD1. Ensuite une autre molécule d'ATP se lie au domaine NBD2 induisant la formation du dimère NBD1-NBD2 et par conséquent le changement conformationnel des domaines MSD1 et MSD2 : le canal est ouvert et laisse passer les ions Cl^-. L'hydrolyse de la molécule d'ATP du domaine NBD2 provoque une déstabilisation du dimère et induit un retour à l'état de repos : le canal est fermé (El Hiani and Linsdell, 2010) (figure 9).

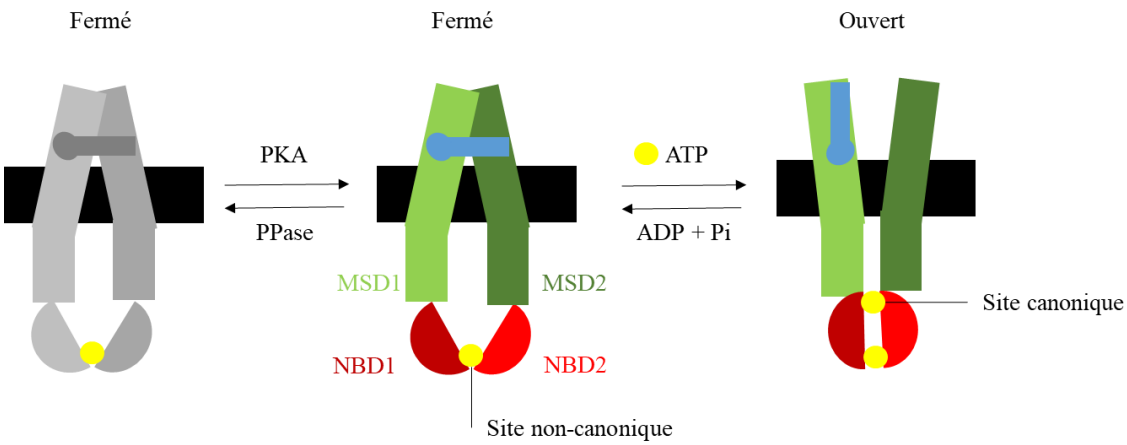


Figure 9 : Mécanismes de régulation du canal CFTR (Eckford et al., 2012).

Par son rôle prépondérant dans la régulation des flux d'ions Cl^- et la régulation d'autres canaux, le canal CFTR joue un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie cellulaire. Aussi des mutations de celui-ci entraînent des conséquences non négligeables sur l'ensemble des organes exprimant ce canal.

5) Mutations de CFTR

Il existe 2 000 mutations du gène *CFTR* recensées dans la base de données *Cystic Fibrosis Mutation Database* (CFTR1 database : http://www/sickkids.on.ca/Home.html) (figure 10). Les caractéristiques de certaines de ces mutations sont disponibles dans la base de données *Clinical and Functional Translation of CFTR* (CFTR2 database : http://cftr2.org/). Une base de données spécifique aux patients français est également disponible (Claustres et al., 2017).

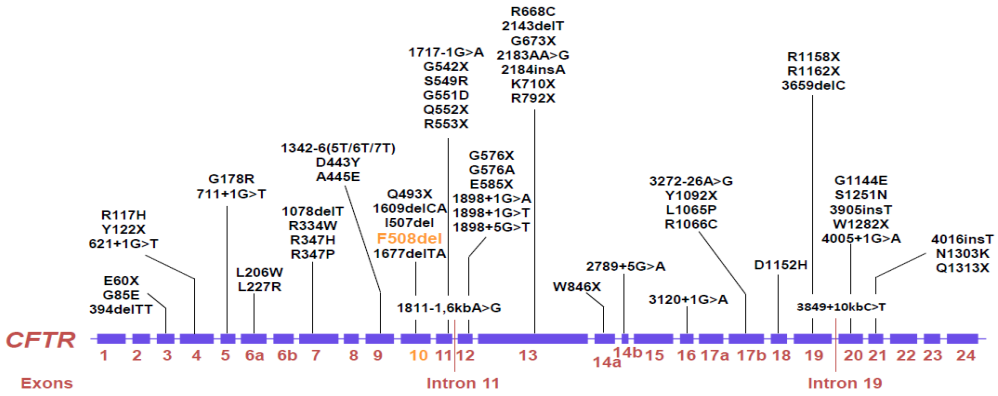


Figure 10 : Schématisation des principales mutations le long du gène *CFTR* (E. Girodon, Hôpital Cochin, Paris).

La classification actuelle de ces mutations est divisée en six groupes en fonction des conséquences fonctionnelles qu'elles provoquent sur la protéine CFTR (figure 11) (Amaral and Farinha, 2013; Quon and Rowe, 2016; Veit et al., 2016). Les mutations des classes 1 à 3 sont associées à des phénotypes plus sévères que celles des classes 4 à 6.

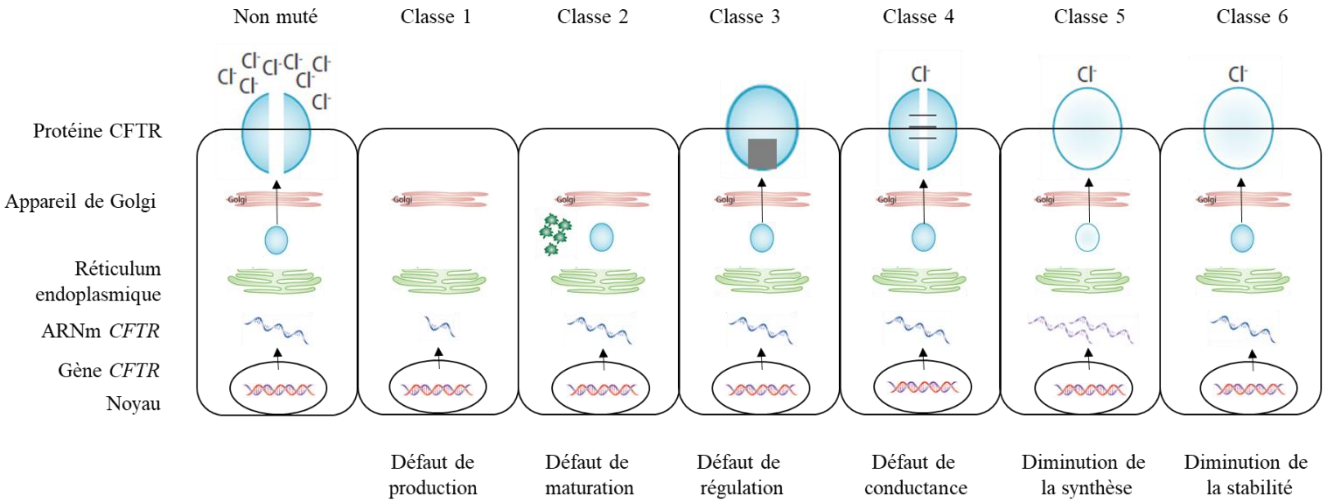


Figure 11 : Classification des mutations du gène *CFTR* en fonction de leurs conséquences fonctionnelles (Boyle and De Boeck, 2013).

Cependant, il faut prendre en considération le fait que plusieurs mutations ne sont toujours pas caractérisées actuellement et certaines mutations présentent des défauts pléïotropiques sous-entendant qu'elles pourraient être classées dans plusieurs classes. En effet, la mutation F508del code une protéine non mature due à une instabilité du domaine NBD1 et est donc en classe 2 (Cheng et al., 1990) mais cette mutation affecte aussi la régulation des efflux Cl^- (classe 3) (Dalemans et al., 1991; Mendoza et al., 2012; Serohijos et al., 2008) et le temps de présence à la membrane plasmique (classe 6) (Okiyoneda et al., 2010; Sharma et al., 2004; Swiatecka-Urban et al., 2005).

Basée sur ces limites, une nouvelle classification est actuellement en cours de débats pour inclure les six classes conventionnelles associées aux 26 combinaisons possibles, totalisant alors 32 classes de mutations du gène *CFTR* (Veit et al., 2016).

a. Mutations de classe 1

La présence d'un codon stop prématuré (ex : G542X non-sens) provoque une déstabilisation de l'ARNm lors de la traduction et empêche la synthèse protéique complète de CFTR (Quon and Rowe, 2016). La protéine, courte ou tronquée sera très vite dégradée. Cette classe de mutation représente 9 % des mutations qui est présente chez 50 % des patients atteints de mucoviscidose en Israël (Bobadilla et al., 2002; Kerem et al., 1997) et chez 15,5 % des patients CF français (registre français de la mucoviscidose – bilan des données 2017). Le phénotype de ces patients est similaire à celui des porteurs de la mutation F508del (classe 2), la plus fréquente chez les patients atteints de mucoviscidose.

b. Mutations de classe 2

Les mutations de cette classe se caractérisent par un défaut de maturation cellulaire de la protéine CFTR qui va s'accumuler au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et se traduisant donc par une présence faible de celle-ci à la membrane plasmique. En condition physiologique, la protéine CFTR est maturée dans le RE et l'appareil de Golgi avant d'être adressée à la membrane plasmique. Pour ces mutations, les protéines CFTR vont être redirigées et dégradées par le protéasome. La mutation F508del est la mutation la plus commune sur au moins 1 allèle chez ~ 80 % des individus atteints de mucoviscidose. Elle correspond à la délétion de la phénylalanine en position 508 de la protéine CFTR (figure 12) de trois nucléotides au niveau de l'exon 10 du gène. En France, 41,4 % des patients sont F508del/F508del et 41,2 % sont hétérozygotes F508del (registre français de la mucoviscidose – bilan des données 2017).

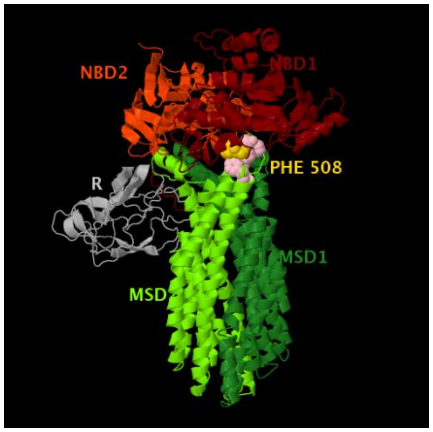


Figure 12 : Localisation de la phénylalanine en position 508 sur l'organisation structurelle de la protéine CFTR (librairiedemolecules.education.fr).

c. Mutations de classe 3

Les mutations de classe 3 (ex : G551D) présentent une protéine correctement synthétisée et localisée à la membrane plasmique, mais dont les domaines NBD1 et 2 sont affectés. La probabilité d'ouverture du canal est plus faible ce qui altère la régulation des efflux Cl^-. Cette mutation est présente chez 2,8% des patients.

d. Mutations de classe 4

Les mutations de classe 4 (ex : R117H, présente chez 2,2% des patients CF) présentent une altération de la conductance du canal Cl^-. La protéine CFTR est correctement formée et localisée à la membrane plasmique mais le flux d'ions et la sélectivité du canal sont altérés.

e. Mutations de classe 5

Les mutations de classe 5 (ex : A455E) présentent un ARNm de *CFTR* instable. Les quantités de protéines adressées à la membrane plasmique sont donc plus faibles.

f. Mutations de classe 6

Les mutations de classe 6 (ex : Q1412X) présentent une protéine CFTR mature localisée à la membrane plasmique mais qui est instable. Aussi même si la protéine est correctement adressée à la membrane apicale des cellules épithéliales, elle est finalement rapidement internalisée et dégradée par le protéasome.

g. Hétérogénéité phénotypique de la mucoviscidose

La présence d'une mutation sévère sur chacun des deux allèles conduit à des formes sévères et classiques de la maladie avec notamment une insuffisance pancréatique exocrine. L'association d'une mutation modérée et d'une mutation sévère ou de deux modérées sont associées à des phénotypes moins sévères.

Cependant pour deux patients porteurs des mêmes mutations, les profils cliniques peuvent être très différents (Cutting, 2005). Chez deux individus monozygotes vivant dans le même environnement, des phénotypes différents peuvent être observés mettant en évidence que l'environnement n'est pas le seul facteur jouant un rôle sur le phénotype de la maladie (Vanscoy et al., 2007). Il existe des « gènes modificateurs » situés à l'extérieur du locus de *CFTR*, capables d'influencer l'expression phénotypique de la mucoviscidose (Corvol et al., 2006; Drumm et al., 2005). Ces gènes modificateurs sont des variants génétiques ou des polymorphismes, pouvant influencer la sévérité de la maladie de façon positive avec un rôle protecteur ou de façon négative avec un rôle délétère.

L'identification de ces gènes modificateurs a été possible *via* le développement de deux approches. Une approche gène-candidat qui se base sur les connaissances de la physiopathologie de la maladie et comportant des effectifs de patients limités. Une approche globale par une analyse du génome entier (*Genome Wide Association Study*, GWAS) avec la formation de consortiums internationaux de recherche de gènes modificateurs incluant de larges cohortes de patients.

En utilisant l'approche du gène candidat, différents gènes modificateurs influençant la sévérité de l'atteinte respiratoire des patients atteints de mucoviscidose ont été mis en évidence : *Transforming Growth Factor beta 1* (TGF-β1), *Mannose Binding Lectin 2* (MBL2) et l'haplotype ancestral 8.1AH (Corvol et al., 2015; Wright et al., 2011). En utilisant l'approche globale, le consortium nord-américain a mis en évidence 7 régions probablement associées à la sévérité de l'atteinte respiratoire et des loci associés à la modification de l'obstruction intestinale néonatale tels que *SLC26A9* (*SoLute Carrier family 26 Member 9*), *SLC6A14* (*SoLute Carrier family 6 Member 14*), *ATP12A* (*ATPase* H^+/K^+ *transporting non-gastric Alpha 2 subunit*), *TARS* (*Threonyl-tRNA Synthetase*), *PRSS1* (*Serine Protease 1*) et *CEBPB* (*CCAAT Enhancer Bindind Protein Beta*) (Gong et al., 2019; Sun et al., 2012). Des variants de *SLC26A9* ont par exemple été montrés comme pouvant modifier le conduit pancréatique des patients CFRD (*Cystic Fibrosis Related Diabetes*), mais pas la fonction pulmonaire sauf dans le cas d'une stimulation des voies aériennes par Ivacaftor (Gong et al., 2019).

L'identification de ces gènes modificateurs et une meilleure connaissance de leurs fonctions dans la mucoviscidose permettraient d'envisager une médecine personnalisée, prédictive, préventive et participative (Corvol et al., 2016) afin d'accéder à une meilleure prise en charge des patients.

4. Diagnostic et dépistage de la mucoviscidose

Le dépistage néonatal de la mucoviscidose est généralisé en France depuis 2002 par le test de Guthrie (Farriaux et al., 2003). La stratégie de dépistage s'effectue en deux temps par dosage de la trypsine immunoréactive (TIR) puis par une recherche des 31 mutations les plus fréquentes de *CFTR* (figure 13). La TIR est une protéine dont la présence est plus abondante en cas d'anomalie pancréatique pendant la vie fœtale et les premiers mois de vie. Le dosage de la TIR est effectué sur un prélèvement réalisé à J3 (systématiquement) après la naissance. L'élévation de la TIR dans le sang (TIR > 60 g/L) est persistant pendant le 1er mois de vie dans la mucoviscidose. Ce test est assez sensible (peu de faux négatifs : 3,7 %) mais peu spécifique (faux positifs).

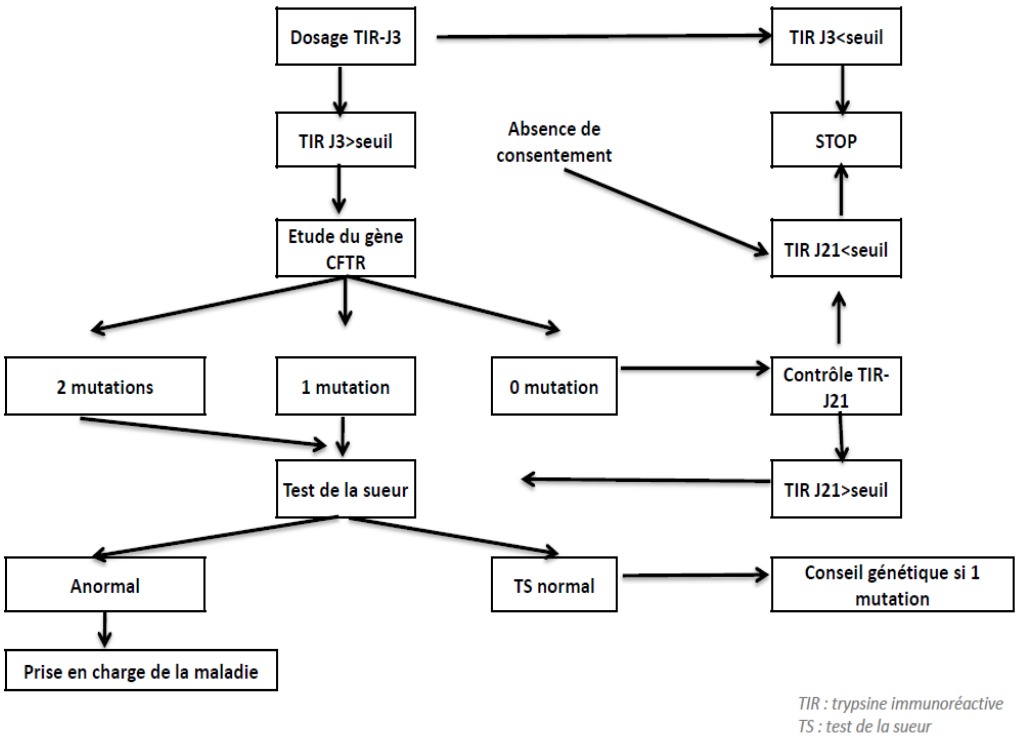


Figure 13 : Dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France (Munck and Roussey, 2008).

La confirmation du diagnostic se fait par un test de la sueur (mesure de la concentration d'ions Cl^-) (Di Sant'Agnese, 1953) : mesure de la sudation par des tampons imbibés de solution de stimulation associée à un courant électrique. Deux électrodes sont fixées sur le bras et après 5 minutes, les tampons sont retirés. Le recueil est effectué à l'aide d'un collecteur placé sur la zone stimulée. Il est considéré comme suffisant lorsqu'il y a 3 à 4 spires de sueur colorées en bleu dans le collecteur. Le collecteur est ensuite récupéré délicatement pour ne pas faire sortir la sueur et transporté au laboratoire pour le dosage des ions chlorures par un chloruromètre. La déficience de CFTR entraîne une absence ou une diminution de l'absorption des ions Cl^- par les glandes sudoripares. Les patients CF ont une sueur salée due à l'augmentation des ions Cl^-, K^+, Na^+.

AGE DU PATIENT	RESULTAT DU DOSAGE	INTERPRETATION
Patient > 2 ans Nourrisson (< 2 ans)	< 40 mM < 30 mM	Test normal
Patient > 2 ans Nourrisson (< 2 ans)	40-60 mM 30-60 mM	Test intermédiaire
Quel que soit l'âge	> 60 mM	Test pathologique

Tableau 1 : Interprétation des résultats en fonction du dosage de la sueur (Sermet-Gaudelus et al., 2010).

Même si le dosage de la TIR est positif, il est nécessaire d'effectuer une analyse moléculaire des principales mutations du gène *CFTR*. Si une ou deux mutations du gène sont identifiées, le nouveau-né et les parents sont convoqués dans un centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose (CRCM) pour une confirmation du diagnostic reposant sur l'évaluation clinique associée à un test de la sueur positif pour mettre en place le traitement et le suivi du nourrisson. Si une seule mutation est retrouvée et que le test de la sueur est négatif, l'hétérozygotie du nouveau-né sera annoncée aux parents lors d'une consultation du conseil génétique. Si aucune mutation n'est retrouvée, un second dosage de la TIR est réalisé à J21 après la naissance et si le dosage est toujours positif, un test de la sueur sera réalisé.

Dans les cas où le diagnostic est difficile, une mesure de la différence de potentiel transépithélial sur muqueuse nasale (DDP nasale) ou intestinale (courant de court-circuit sur biopsie rectale) est effectuée. Le transport des ions à travers l'épithélium nasal/intestinal entraîne une différence de potentiel mesurable de manière simple, peu invasive. Chez des sujets sains, la DDP est de l'ordre de -20 mV (milliVolt) contre -45 mV chez les patients atteints de mucoviscidose (Sands, 2013).

Le diagnostic est effectué par un dépistage néo-natal systématique depuis 2002. Des adultes présentant des signes cliniques évocateurs (problèmes respiratoires, digestifs ou infertilités) peuvent être atteints de la mucoviscidose et diagnostiqués plus tardivement. De même, un dépistage pré-natal est recommandé pour les couples dont les deux parents sont hétérozygotes pour le gène *CFTR* ou ont déjà eu un enfant atteint de mucoviscidose. Si le fœtus est atteint de la pathologie, une interruption médicale de grossesse est proposée au couple.

5. Manifestations cliniques extra-pulmonaires

La mucoviscidose est une maladie qui touche les épithélia sécréteurs de nombreux organes due à un épaississement des sécrétions (poumons, foie, intestins, pancréas, appareil génital). L'atteinte pulmonaire est néanmoins prédominante ; elle est la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients. Cependant les manifestations restent très variables d'un patient à l'autre et cela même au sein d'une même famille.

1) Digestives

a. Atteinte gastro-intestinale

L'iléus méconial, se traduit par l'absence d'émission de méconium au cours des premiers jours de vie et est l'un des premiers symptômes observé chez 15-20 % des nouveau-nés atteints de mucoviscidose (Ooi and Durie, 2016). Par la suite les patients vont aussi présenter des troubles de la motilité gastrique intestinale pouvant entraîner un prolapsus rectal, une obstruction partielle ou complète de l'intestin grêle, des reflux gastro-œsophagiens fréquents et une constipation fréquente.

D’autres symptômes ont été rapportés tels que des troubles de l’absorption intestinale : malabsorption des nutriments par les entérocytes et augmentation de la perméabilité intestinale entraînant une stimulation des antigènes et plus fréquemment une intolérance aux protéines de lait de vache (IPLV), une maladie cœliaque ou la maladie de Crohn.

b. Atteinte pancréatique

La manifestation exocrine est présente chez 85% des patients et est en lien avec les mutations de CFTR (classes 1, 2, 3). L’accumulation du mucus au niveau des canaux biliaires pancréatiques provoque une obstruction de ceux-ci aboutissant alors à la mise en place d’une fibrose progressive, une infiltration de lipides et des dépôts amyloïdes qui sur le long terme conduisent à la destruction cellulaire des îlots de Langerhans et à la dysfonction spécifique des cellules β (Siwamogsatham et al., 2014). L’insuffisance de la sécrétion en lipase, trypsine et chymotrypsine observée chez la majorité des patients provoque une maldigestion et malabsorption des graisses et des protéines (Dodge and Turck, 2006). Cela provoque des selles fréquentes, abondantes et graisseuses, des difficultés de croissance staturo-pondérale et une carence en vitamines liposolubles (A, D, E, K) et en acides gras essentiels (Ledder et al., 2014; Ripa et al., 2002).

La manifestation endocrine est le diabète ou CFRD, à la fois de type 1 (destruction de plus de 50% des îlots de Langerhans non auto-immun) et de type 2 (intolérance au glucose mais sans insulino-résistance, ni variation de l’insulinosensibilité) et un déficit en glucagon d’où l’apparition tardive du diabète (O'Shea and O'Connell, 2014) (tableau 2). Les patients présentent peu d’acidocétose et des hypoglycémies parfois sévères lors de l’initiation de l’insulinothérapie. Le diabète relatif à la mucoviscidose est associé à une augmentation de la sévérité de la pathologie pulmonaire avec l’âge, une diminution de la survie, une diminution du statut nutritionnel et une perte de la fonction pulmonaire (Milla, 2004).

	TYPE 1	TYPE 2	CFRD
APPARITION DU DIABETE	Aiguë	Silencieuse	Silencieuse
PERIODE D'APPARITION	Enfance et adolescence	Age adulte	18-24 ans
ANTICORPS (+)	Oui	Non	A priori non
SECRETION D'INSULINE	Absente	Diminuée	Sévèrement diminuée
SENSIBILITE A L'INSULINE	Plutôt diminuée	Sévèrement diminuée	Plutôt diminuée (sérieusement si maladie aiguë)
COMPLICATION MICROVASCULAIRES	Oui	Oui	Oui mais moins importante
COMPLICATIONS MACROVASCULAIRES	Oui	Oui	Non
CAUSE DE DECES	Maladie cardiovasculaire	Maladie cardiovasculaire	Maladie pulmonaire

Tableau 2 : Comparaison des diabètes de type 1 et 2 au diabète associé à la mucoviscidose (O'Riordan et al., 2010).

c. Atteinte hépatobiliaire

L'atteinte hépatique représente la deuxième cause de mortalité des patients CF. La *Cystic Fibrosis Liver Disease* (CFLD) est caractérisée par l'accumulation d'un matériel granuleux dans les canalicules biliaires intra-hépatiques entraînant une augmentation de la viscosité de la bile créant une obstruction, la cholestase pouvant aboutir à une cirrhose dans 5 % des cas. Les complications vésiculaires asymptomatiques fréquentes sont les microvésicules (< 25 %) et la lithiase (50 %, adulte). Les atteintes hépatiques diffèrent et leurs fréquences augmentent avec l'âge (Boelle et al., 2019) : de l'hépatosplénomégalie à la stéatose ou cirrhose biliaire focale/multi-lobulaire (Debray, 2012).

2) Génitales

Chez la femme, l'atteinte est due à un épaississement de la glaire cervicale conduisant à une hypofertilité (Kotloff et al., 1992). Les grossesses chez les femmes atteintes de mucoviscidose ne sont plus rares.

Chez l'homme, l'atteinte se traduit par une infertilité due à une atrésie bilatérale congénitale des canaux déférents et une absence concomitante des vésicules séminales entraînant une azoospermie dans 95% des cas (Wong, 1998).

3) Osseuses

La protéine CFTR ne serait pas présente uniquement au niveau des épithélia sécréteurs mais aussi dans des cellules osseuses humaines (ostéoblastes et ostéoclastes). Certains patients CF présentent des *CF-related Bone Disease* (CFBD), une déminéralisation osseuse avec ostéopénie chez 85 % des adultes et ostéoporose chez 13-50 % des adultes (Sermet-Gaudelus et al., 2007). La prévalence de cette atteinte osseuse est de 5 % chez les enfants CF et de 60 % chez les adultes de plus de 45 ans (Paccou et al., 2010).

Cette atteinte est associée à la sévérité de la pathologie pulmonaire, à une nutrition pauvre (malabsorption, déficit protéino-calorique, déficit en vitamine D et K), au génotype de CFTR spécifique, à une inflammation chronique, à une inactivité physique et à l'augmentation du risque de fracture, aussi un bilan clinique est recommandé pour ces patients CF (Shead et al., 2010). Il a aussi été montré que le déficit fonctionnel de CFTR implique l'altération de l'activité ostéoblastique présente chez les patients CF (Jacquot et al., 2016) ainsi que l'activité de résorption et de différenciation des ostéoclastes (Velard et al., 2015; Velard et al., 2018).

4) Rénales

Une altération de la fonction de CFTR entraîne un défaut du transport des protéines de bas poids moléculaires dans le tube proximal conduisant à une protéinurie, une augmentation de l'excrétion d'aminoglycoside rénal, une hyponatrémie, une hypokaliémie et une diminution du volume extracellulaire profond (Nazareth and Walshaw, 2013). Les pathologies rénales sont rares mais deviennent plus communes avec l'âge. Les facteurs de risques sont la transplantation pulmonaire, la CFRD et les épisodes fréquents de lésions rénales.

5) Glandes sudoripares

Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'atteinte des glandes sudoripares se caractérise par une sensibilité à la déshydratation, un syndrome de perte de sel et une modification ionique de la sueur.

6) ORL

L'inflammation chronique retrouvée au niveau nasal favorise le développement de polypes nasaux. Leurs présences contribuent à l'installation de sinusites chroniques chez le patient atteint de mucoviscidose (Mohd Slim et al., 2016; Weber et al., 2017).

6. Manifestations cliniques pulmonaires

Afin de mieux comprendre l'impact des mutations de CFTR sur les poumons, il est nécessaire de décrire leurs organisations anatomiques et histologiques.

1) Physiologie pulmonaire

a. Généralités

Le poumon est l'organe qui nous permet de respirer. Les poumons sont matures à 20-25 ans et commencent à perdre de leur fonctionnalité avec l'âge autour de 35 ans. L'appareil respiratoire est anatomiquement composé de deux parties, les voies aériennes (VA) hautes s'étendant de la cavité orale et des fosses nasales aux deux bronches souches (cavité nasale, cavité buccale, pharynx, larynx, trachée) et les voies aériennes basses dites respiratoires s'étendant des bronches souches aux alvéoles, siège des échanges gazeux (bronches, bronchioles, alvéoles) (figure 14).

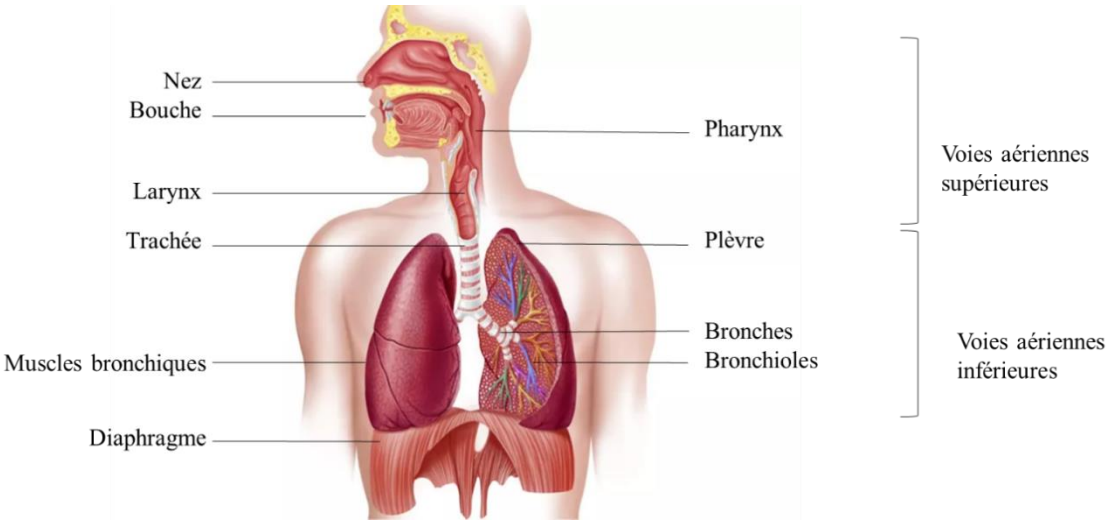


Figure 14 : Anatomie de l'appareil respiratoire ; voies supérieures et inférieures (https://www.thoughtco.com/respiratory-system-4064891).

Les voies respiratoires ont pour principale fonction d'assurer les échanges gazeux avec le sang pour distribuer l'oxygène à l'ensemble des organes de notre corps. L'appareil respiratoire comporte une portion conductrice de l'air s'étendant des cavités nasales aux bronchioles terminales ayant pour fonction la conduction et le conditionnement (réchauffer, humidifier, épurer) de l'air et une portion respiratoire constituant la zone des échanges gazeux entre l'air et le sang au niveau de la barrière alvéolo-capillaire (figure 15).

Pour optimiser l'épuration de l'air inspiré, on trouve au niveau des bronches un épithélium complexe composé notamment de cellules ciliées et de glandes sous-muqueuses. Ces dernières produisent du mucus dont la fonction est de piéger les particules potentiellement pathogènes.

Les cils des cellules ciliées en battant de manière synchrone vont permettre l'évacuation du mucus ; c'est la clairance mucociliaire.

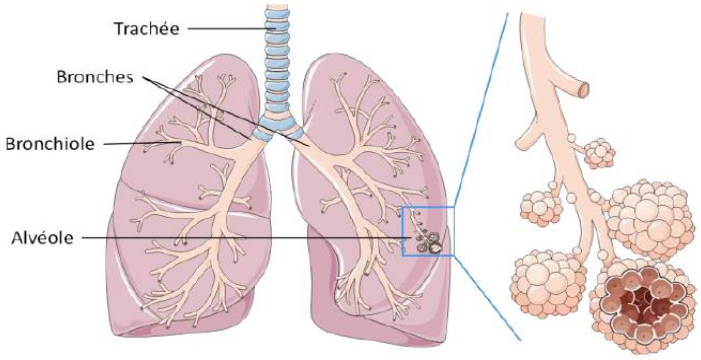


Figure 15 : Représentation des voies aériennes avec un zoom sur les alvéoles.

b. Epithélium des voies aériennes

Un épithélium est un tissu formé d'une ou plusieurs couches de cellules juxtaposées et solidaires recouvrant la surface externe ou les cavités internes de l'organisme.

La paroi des VA comprend des éléments épithéliaux, musculaires et vasculaires compris dans un tissu conjonctif. La paroi peut être divisée généralement en une muqueuse (un épithélium de surface, une membrane basale et une lamina propria) et une sous-muqueuse plus épaisse contenant des systèmes glandulaires, des muscles, du cartilage et un adventice relativement fin (figure 16). On trouve également dans cette paroi des nerfs et des éléments lymphatiques.

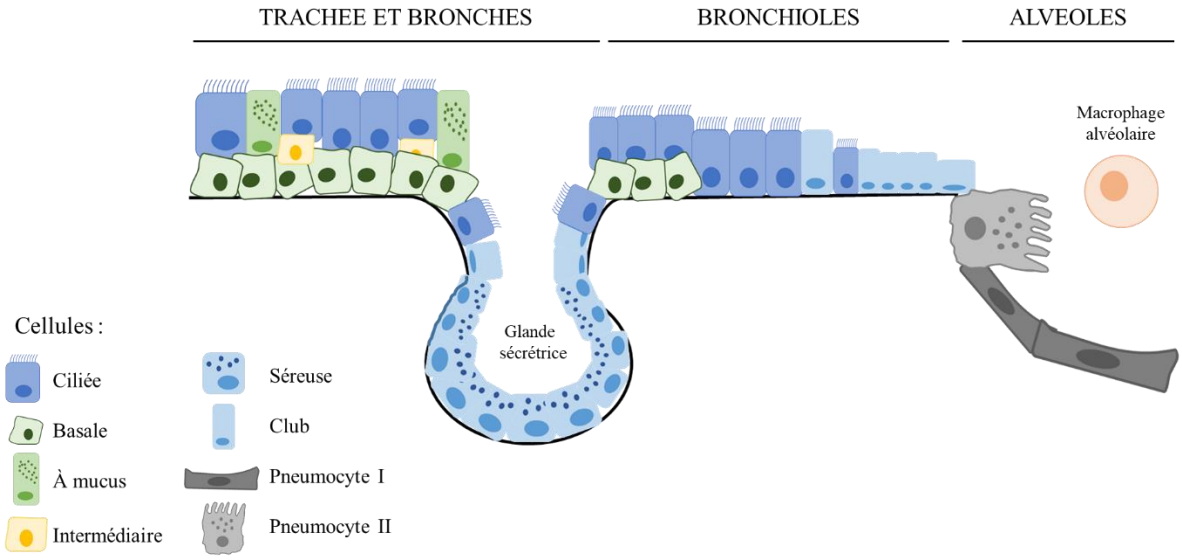


Figure 16 : Représentation de l'organisation des différentes populations cellulaires de l'épithélium des voies aériennes. L'épithélium des voies aériennes comprend trois segments : l'épithélium bronchique, l'épithélium bronchiolaire et l'épithélium alvéolaire ainsi que huit types cellulaires différents (Antunes et al., 2013). Les ionocytes étant peu décrits dans la littérature, ils ne figurent pas sur cette représentation.

La nature de l'épithélium change en fonction de la localisation de l'arbre trachéo-bronchique. Au niveau des fosses nasales, on va avoir un épithélium pluri-stratifié, squameux et kératinisé. De la trachée aux bronches, la lumière des VA est recouverte d'un épithélium pseudo-stratifié puis un épithélium cuboïde simple est retrouvé au niveau des bronchioles terminales. Les alvéoles sont recouvertes d'un épithélium simple.

Le rôle principal de l'épithélium des voies aériennes est d'assurer la protection de la muqueuse respiratoire par rapport aux pathogènes inhalés. Pour ce faire, l'épithélium des voies aériennes et respiratoires est constitué de différentes populations cellulaires assurant chacune des fonctions différentes (figure 17).

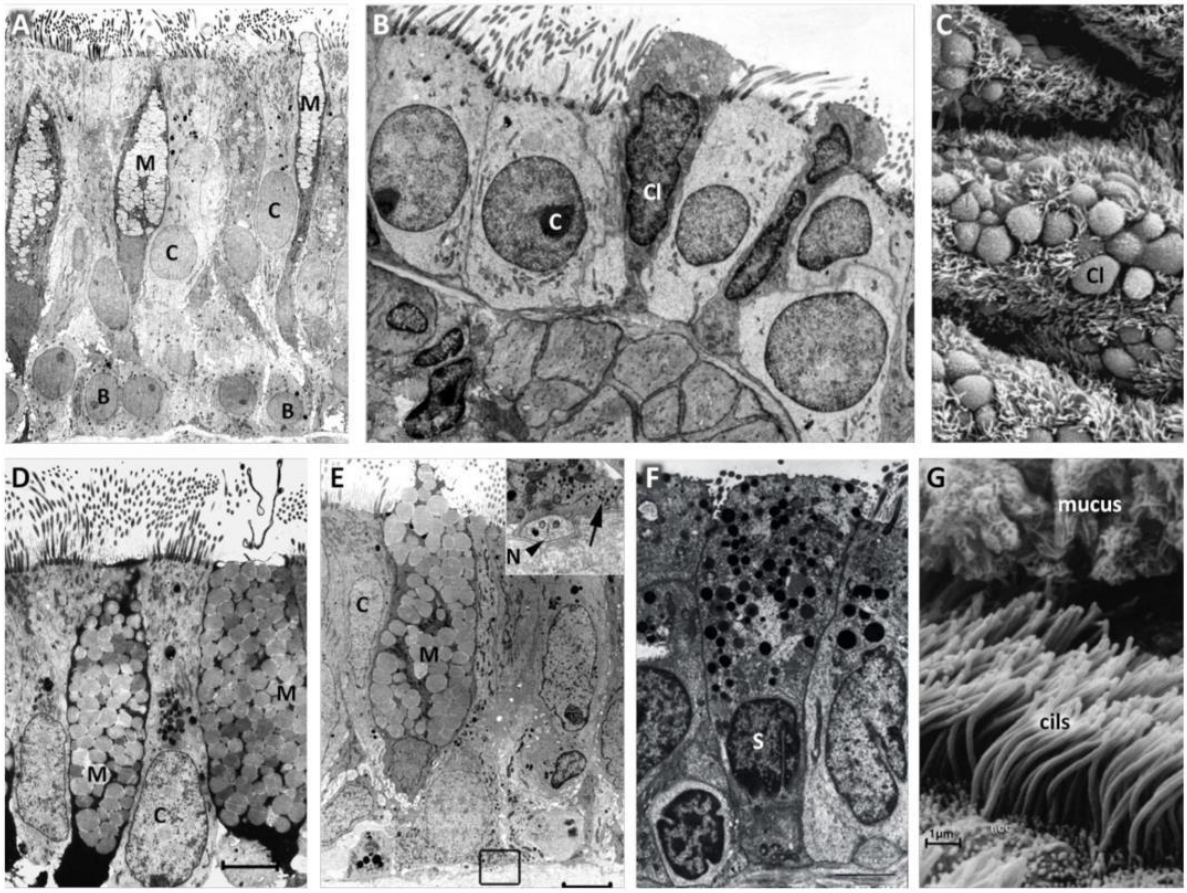


Figure 17 : Les différents types cellulaires épithéliaux des voies aériennes. Microscopie électronique à transmission montrant les cellules ciliées (C), basales (B), à mucus (M), séreuses (S), club (Cl) et neuroendocrines (N) (Berube et al., 2010; Gibson, 2002; Jeffery and Li, 1997; Moran, 1988; Ross, 2006).

Les cellules ciliées

En forme de colonne recouverte de cils, les cellules ciliées sont les plus abondantes de l'épithélium des voies aériennes (> 50 %). Deux cents à trois cents cils vibratiles par cellule, au pôle apical, sont mis en mouvement grâce à la production d'ATP fourni par les mitochondries présentes en grand nombre ainsi qu'un appareil de Golgi développé (Sleigh et al., 1988).

Les cils vont permettre l'évacuation du mucus tapissant l'épithélium pulmonaire vers le système digestif en battant de manière synchrone (Knight and Holgate, 2003).

Les cellules à mucus

Les cellules à mucus comportent des granules confluentes contenant des mucines acides et de l'acide sialique. Le mucus a pour fonction d'enrober les poussières, les débris cellulaires et tout organisme potentiellement pathogène qui seront par la suite éliminés. Ces cellules ont également un rôle dans la production de peptides antimicrobiens.

Il existe un lien physiologique et physique étroit entre les cellules ciliées et les cellules à mucus (figure 17, G). Les cils des cellules ciliées sont en contact avec le mucus par leurs extrémités munies de crochets. Les cellules ciliées d'une même portion d'épithélium vont battre de manière synchrone et grâce au contact physique établi avec le mucus de la lumière, vont permettre la mise en mouvement de celui-ci. Le mucus ayant piégé les particules potentiellement nocives va remonter l'arbre trachéo-bronchique jusqu'à la trachée. L'épiglotte va se soulever et laisser le mucus passer dans l'œsophage. Ce processus de nettoyage, essentiel pour une fonction de respiration optimale, se nomme la clairance mucociliaire.

Les cellules séreuses

Les cellules séreuses présentent un RE granuleux très développé mais contrairement aux cellules à mucus, elles contiennent très peu de granules denses aux électrons (Basbaum et al., 1990). La surface de ces cellules ressemble à celles des glandes sous-muqueuses. Certaines de ces cellules contiennent des mucines neutres et d'autres composés non-mucoïdes, probablement des lipides. Leur fonction est d'établir un équilibre hydrique au niveau de la lumière des voies aériennes pour contribuer à un mouvement ciliaire harmonieux.

Les cellules club

Elles sont en général restreintes aux bronchioles terminales. Typiquement, elles bourgeonnent à la lumière de l'épithélium et contiennent des granules électron-denses. Ces cellules sécrètent des protéines du surfactant (SP) (A et B) alvéolaire ainsi que la CC10 (*Club Cell* 10) jouant un rôle anti-inflammatoire (Singh and Katyal, 1997). Elles pourraient aussi être des cellules souches et pourraient métaboliser des agents chimiques d'origine environnementale tels que des agents carcinogènes.

Les cellules neuroendocrines ou cellules de Kultchitsky et Feyrter

Ce sont des cellules basales présentes en faible quantité mais souvent avec une prolongation cytoplasmique étroite vers la lumière et pouvant être en contact avec des fibres nerveuses au niveau des corps neuro-épithéliaux (Weichselbaum et al., 2005).

Ces cellules produisent différents peptides et neuropeptides comme la bombésine qui pourraient influencer le tonus des muscles lisses proximaux, mais également l'activité ciliaire et la production de mucus.

Les cellules basales

La couche de cellules basales contribue à donner à la trachée et aux bronches l'apparence pseudo-stratifiée de l'épithélium (Evans and Plopper, 1988). Le cytoplasme de ces cellules est peu développé avec la présence de cytokératine. Les cellules basales sont encore considérées comme les cellules souches à l'origine des cellules ciliées et à mucus de la trachée et des bronches, mais leur fonction fait l'objet de discussions.

Dans des situations d'agression, les cellules basales jouent un rôle central prolifératif et vont permettre de repeupler les régions de l'épithélium où s'est produite une lésion avec destruction partielle ou totale de celui-ci. Les cellules vont être les premières à migrer vers la zone lésée et à recoloniser en une vingtaine de minutes la blessure en établissant des contacts entre elles. Elles forment ainsi une barrière physique entre la lumière des VA et la membrane basale. En plus de ces fonctions prolifératives et réparatrices, ces cellules permettent également une meilleure résistance de l'épithélium en consolidant la liaison des cellules au niveau de la membrane basale par des hémidesmosomes (Evans et al., 1990).

Les pneumocytes

Au niveau alvéolaire, lieu des échanges gazeux entre l'air et la circulation sanguine, deux principaux types cellulaires sont présents : les pneumocytes I et II (figure 18).

Les pneumocytes de type I contiennent peu d'organites cytoplasmiques mais possèdent des extensions cytoplasmiques qui leur permettent de s'étendre sur plus d'une alvéole pour faciliter les échanges gazeux (95 % de la surface épithéliale alvéolaire). Les pneumocytes sont aussi connectés entre eux par des jonctions serrées permettant une perméabilité sélective aux fluides, aux molécules et aux ions. Cependant leur finesse les rend extrêmement sensibles aux attaques des pathogènes.

Les pneumocytes de type II sont plus gros et deux fois plus nombreux que les pneumocytes I. De forme cuboïde, ils ne vont occuper que 5 % de la surface de l'épithélium alvéolaire, souvent au niveau du coin de l'alvéole mais représentent 60 % des cellules épithéliales alvéolaires (Castranova et al., 1988). Leur surface apicale présente de nombreuses microvillosités et leur cytoplasme contient de nombreuses mitochondries aux crêtes bien développées, du RE rugueux, du Golgi et des corps lamellaires volumineux caractéristiques de la cellule. Ces corps lamellaires contiennent le surfactant qui va recouvrir toute la surface de l'alvéole en formant un film fin de faible densité. Les cellules de type II sont également des cellules souches qui peuvent se dédifférencier et se diviser pour remplacer les pneumocytes I morts.

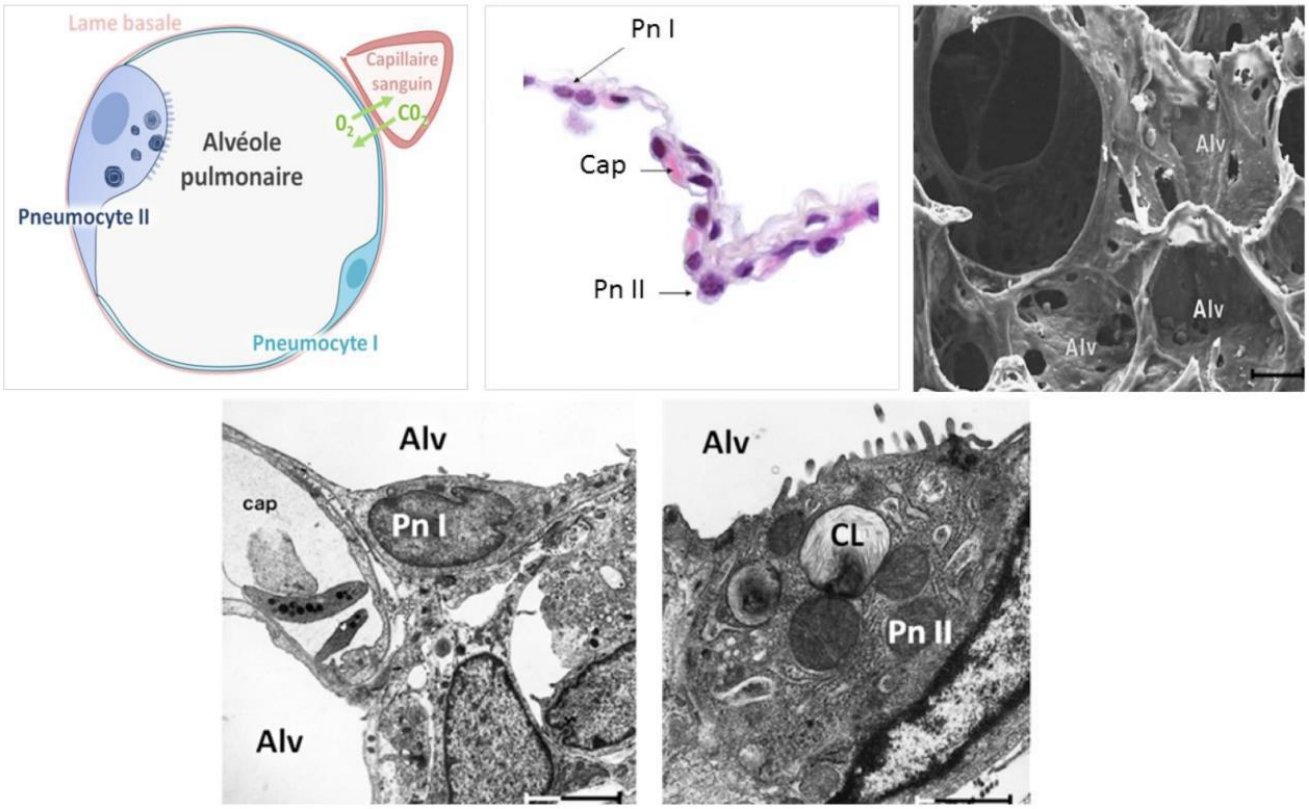


Figure 18 : L'épithélium alvéolaire. Représentation schématique de l'épithélium alvéolaire et images de microscopie optique (Alv : alvéoles, Cap : capillaires, Pn I : pneumocytes de type I, PnII : pneumocytes de type II) (Gibson, 2002; Glowacka et al., 2011).

Les ionocytes

Les ionocytes représentent une population de cellules pulmonaires rares, de ~ 1 % des cellules épithéliales (Hawkins and Kotton, 2018). Les ionocytes seraient dérivés de cellules basales et responsables de l'expression de plus de 90 % de la protéine CFTR dans les voies aériennes (Montoro et al., 2018; Plasschaert et al., 2018). Ces cellules co-expriment FOXI1 (*Forkhead Box I1*) et plusieurs sous-unités de la pompe V-ATPase vacuolaire, en plus de CFTR. Elles joueraient donc un rôle dans la régulation du pH (Plasschaert et al., 2018).

c. Liquide de surface des voies aériennes

Il est constitué d'une hypophase aqueuse, le liquide périciliaire et d'une surface composée de matériel osmophile constitué d'une multicouche de phospholipides, le mucus (figure 19).

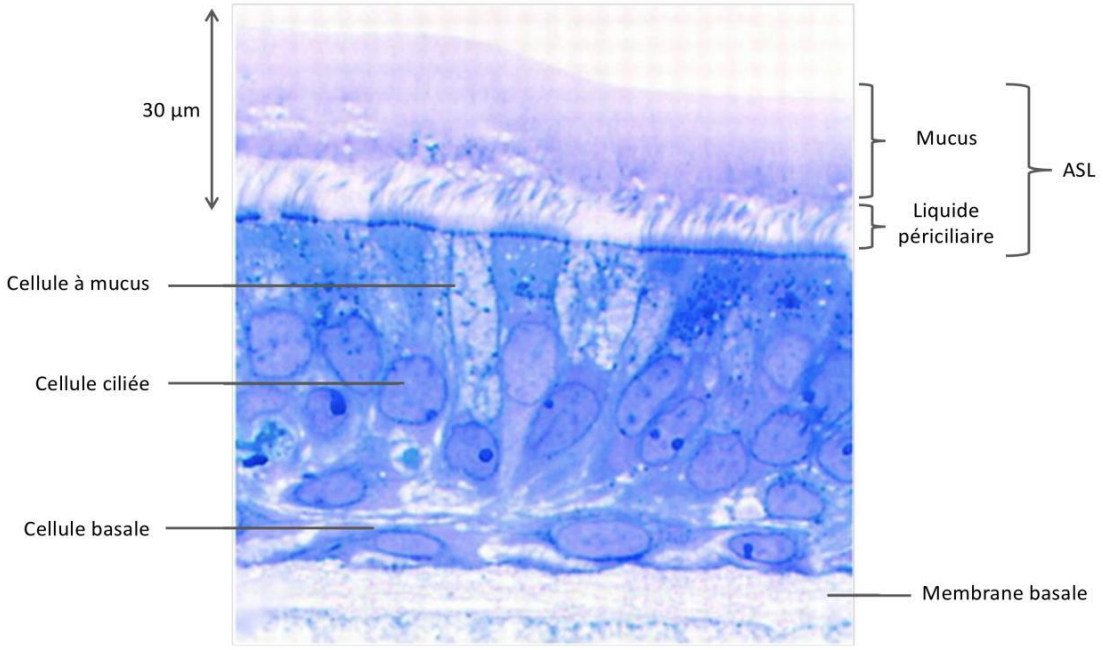


Figure 19 : Liquide de surface des voies aériennes (ASL). Image de microscopie optique d'une culture de cellules épithéliales bronchiques humaines cultivées en interface air-liquide (Matsui et al., 1998).

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

Le mucus est plus dense, produit par les cellules à mucus et séreuses, et est composé de 95 % d'eau, 2-3 % de protéines/glycoprotéines (ex. : mucines), 1 % de lipides et 1 % de minéraux et d'ions. Par sa contenance en peptides anti-microbiens, en anti-oxydants et anti-protéases, il participe à la défense de l'épithélium des voies aériennes.

L'épithélium alvéolaire est recouvert par le surfactant dont la constitution est largement lipidique (90 % de phospholipides) mais il contient également des protéines (10 %) dont certaines spécifiques : les SP et 2 % de carbohydrates. Les SP-B et -C sont essentielles pour établir la structure multicouche du surfactant. D'autres protéines du surfactant, les SP-A et -D sont, elles, associées à la fonction d'immunité (agrégation des bactéries et phagocytose). Le surfactant a donc différentes fonctions : tensio-active en permettant d'éviter le collapsus alvéolaire à la fin d'une expiration, en réduisant la tension de surface lors d'une inspiration, immunitaire en stimulant la phagocytose et la migration des macrophages.

2) Physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose

Chez un jeune enfant, l'atteinte pulmonaire est peu spécifique et caractérisée par des bronchites récidivantes et une toux persistante. Chez un enfant plus âgé, la toux est grasse et chronique, les expectorations muco-purulentes, et des signes d'insuffisance respiratoire chronique peuvent apparaître tels qu'une cyanose et un hippocratisme digital.

Des épisodes de surinfection font leurs apparitions, caractérisés par l'apparition ou la recrudescence de la toux, des modifications de l'aspect des expectorations, une modification de la dyspnée, une diminution de la tolérance à l'effort, une asthénie et une perte de poids/anorexie, ainsi qu'une baisse de l'appétit.

La fonction respiratoire est évaluée par une exploration fonctionnelle respiratoire avec la mesure du Volume Expiratoire Maximal par Seconde (VEMS) (figure 20), une surveillance de la saturation en O_2 (dioxygène) et un test d'effort, associés à une évaluation radiologique avec une évaluation du parenchyme pulmonaire et l'apparition de bronchectasies par tomodensitométrie, ainsi qu'une évaluation microbiologique (ECBC : Examen CytoBactériologique des Crachats, qualitatif et quantitatif). En fonction de l'âge des patients les bactéries retrouvées dans les ECBC vont varier.

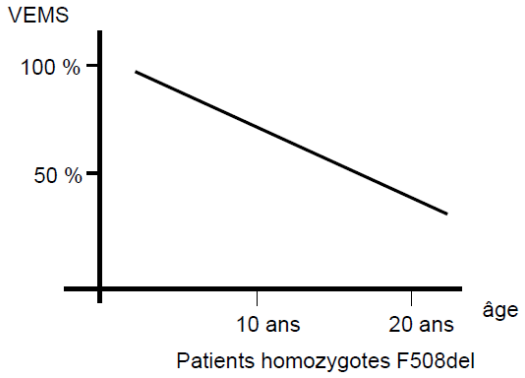


Figure 20 : Le VEMS reflète la sévérité de l'atteinte respiratoire, exprimé en % des valeurs attendues pour l'âge et la taille ; facteur déterminant du pronostic. La dégradation du VEMS est en moyenne d'environ 1,5 % par an chez les patients atteints de mucoviscidose.

Au niveau pulmonaire, l'absence ou la déficience de CFTR entraîne un déséquilibre ionique caractérisé par une diminution de la sortie des ions Cl^-, une augmentation de l'entrée d'ions Na^+ et une déshydratation du liquide de surface. L'hyperviscosité résultante altère la clairance mucociliaire (Boucher, 2002) favorisant la colonisation bactérienne et la mise en place de cycles infection-inflammation qui sur le long terme vont dégrader l'épithélium pulmonaire des patients entraînant une insuffisance respiratoire chronique puis terminale.

Diverses communautés de bactéries, n'étant pas considérées comme pouvant entraîner des infections chez les patients CF dominent les poumons avant que les pathogènes n'apparaissent, généralement quand la fonction pulmonaire est encore préservée (Brown et al., 2014; Coburn et al., 2015; Frayman et al., 2017; Madan et al., 2012; Muhlebach et al., 2018; Pittman et al., 2017). Les jeunes patients CF sont généralement infectés par *Haemophilus influenzae*, puis *Staphylococcus aureus* et enfin *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)* (figure 21).

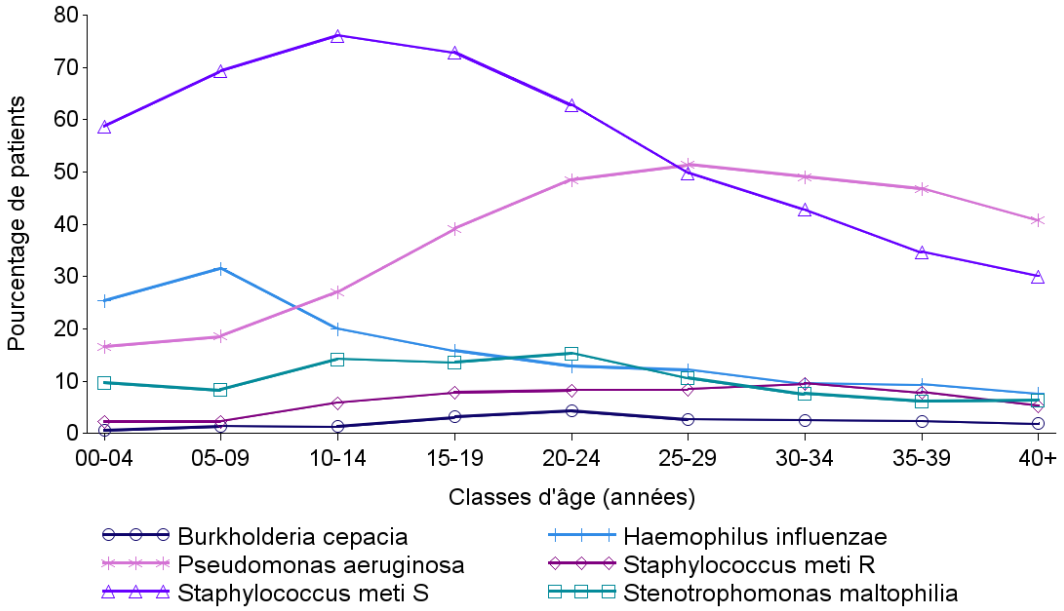


Figure 21 : Représentation des bactéries cliniquement importantes dans la mucoviscidose par classes d'âges en France (d'après le registre français de la mucoviscidose 2017).

3) Inflammation pulmonaire

a. Généralités : Défense immunitaire et inflammation

Les cellules épithéliales représentent la première ligne de défense contre les infections, en activant les cellules inflammatoires et en sécrétant des molécules permettant d'alerter le système immunitaire qui intervient afin de lutter contre les pathogènes *via* les réponses innée et acquise. La balance entre le système immunitaire et l'inflammation doit être régulée et contrôlée pour qu'elle ne soit pas délétère pour l'organisme (Si-Tahar et al., 2009).

Suite à une infection, l'immunité innée intervient en induisant une réaction inflammatoire *via* les cellules immunitaires telles que les macrophages, les cellules dendritiques ou les polynucléaires neutrophiles (PNN). Des récepteurs, les PRR (*Pattern-Recognition Receptors*) tels que les TLR (*Toll-Like Receptors)* (Kawai and Akira, 2010) exprimés au pôle apical des cellules immunitaires vont reconnaître des motifs spécifiques, les PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) retrouvés sur la paroi des pathogènes (Hallstrand et al., 2014).

Les macrophages, peu présents le long des voies aériennes, sont majoritairement au niveau des alvéoles et ont des propriétés de phagocytose et de sécrétion. Au contact des pathogènes, ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires : *Tumor Necrosis Factor-α* (TNF-α), *Interleukine* (IL)-1β, IL-6 et IL-8 ayant pour faculté le chimiotactisme des PNN (Takabayshi et al., 2006).

Les cellules dendritiques ont un rôle de présentation d'antigène (CpAg) et activent les cellules immunitaires effectrices localisées au niveau de l'épithélium respiratoire, phénomène primordial dans la réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire et humorale (Jahnsen et al., 2006). Les antigènes étrangers vont ainsi être présentés aux lymphocytes T qui vont alors proliférer. Bien que la plupart des lymphocytes T meurent par apoptose, certaines cellules subsistent et deviennent des cellules mémoires formant ainsi la mémoire immunologique qui assure une protection immune acquise et durable.

Les PNN, issus du sang circulant, sont essentiels à la réponse immunitaire contre les pathogènes (Sibille and Reynolds, 1990) en migrant dans les tissus infectés en réponse à la production locale de facteurs chimiotactiques (Nelson et al., 1995) et en phagocytant les pathogènes.

L'inflammation est une réaction de défense immunitaire de l'organisme. La réponse inflammatoire est une réponse aiguë contre toute agression extérieure permettant au reste du système immunitaire de se mobiliser pour des blessures (Ward, 2003). Différents facteurs peuvent influencer les réponses inflammatoires incluant le micro-environnement tissulaire, les pathologies, l'énergie, le stress, le voisinage et les variations saisonnières (Nelson, 2004). Le contrôle de cette réponse inflammatoire représente un enjeu majeur : si l'initiation du processus nécessite la détection d'un élément du non-soi ou d'une lésion tissulaire, la réaction inflammatoire en elle-même ne différencie pas le soi du non-soi ou le tissu sain du tissu lésé. Pour pallier cela, il existe un rétrocontrôle négatif exercé par des médiateurs anti-inflammatoires. Dans certaines pathologies, telle que la mucoviscidose, ce processus est dérégulé et une inflammation chronique s'installe, provoquant une destruction du tissu sain associée à une perte de fonction de l'épithélium (Lawrence and Gilroy, 2007; Lee et al., 2009).

Dans le contexte de la mucoviscidose, deux hypothèses s'affrontent concernant l'origine de l'inflammation (Welsh and Smith, 1995) :

- L'inflammation serait déclenchée par une infection et la dérégulation de son processus empêcherait tout arrêt de la réaction inflammatoire.
- L'inflammation précèderait l'infection due au dysfonctionnement intrinsèque du canal CFTR.

L'état inflammatoire est présent chez les patients ne présentant pas d'infection respiratoire (Armstrong et al., 1997; Muhlebach et al., 1999; Tirouvanziam et al., 2000). La notion d'inflammation primitive a été décrite par l'équipe de Khan.

Une étude réalisée chez des enfants CF âgés de 6 mois, a montré que dans des LBA, il y avait une forte concentration de PNN ainsi qu'un taux élevé d'IL-8. De plus, la présence d'élastase α-1-antiprotéase chez les enfants âgés de 1 à 12 mois avant même la présence d'infection indique la présence d'une inflammation primitive initiée par des mécanismes non infectieux (Balough et al., 1995; Khan et al., 1995). Cependant, divers facteurs peuvent influencer les résultats et entraîner de faux négatifs pour les infections, dus aux dilutions de concentration bactérienne pour la détection des pathogènes.

L'étude d'une greffe de trachée ou de voies aériennes plus distales (bronchioles et alvéoles) CF humaines issues de fœtus non infectées dans des souris immunodéprimées (SCID : *Severe Combined ImmunoDeficiency*) provoque une augmentation des concentrations d'IL-8 et du recrutement des neutrophiles murins au niveau de l'épithélium respiratoire humain reconstitué (Tirouvanziam et al., 2000; Tirouvanziam et al., 2002). Les poumons de patients CF sont non infectés à la naissance mais avec le temps des infections passagères puis permanentes se développent (Burns et al., 2001). En 2007, la surexpression des protéines pro-inflammatoires dans les VA de fœtus CF âgés de 24 semaines a été mise en évidence (Verhaeghe et al., 2007a). Plus récemment, en 2019, l'environnement inflammatoire dû à la présence d'un mucus plus visqueux, caractérisé par une augmentation de la quantité de mucine (MUC5AC et MUC5B), a été mis en évidence dans des LBA de jeunes patients CF par rapport à des sujets sains (~ 3 ans) en dehors de toute infection (Esther et al., 2019). Lorsque le mucus a atteint une certaine densité, couplé à un environnement hypoxique, les conditions anaérobiques deviennent alors favorables à l'invasion par des pathogènes tels que *P. aeruginosa* (Flynn et al., 2016; Livraghi-Butrico et al., 2017; Mirkovic et al., 2015).
Enfin, les enfants CF avant l'établissement d'infection initiale montrent une infiltration de neutrophiles péribronchiques qui témoignent d'une inflammation active au sein des tissus (Chandler et al., 2018; Law and Gray, 2017; Mall et al., 2016; Margaroli et al., 2018; Mott et al., 2012; Pillarisetti et al., 2011).

Toutes ces études tendent vers le fait que l'inflammation précèderait l'infection ou que le dysfonctionnement intrinsèque du canal CFTR participerait à la non-résolution de l'inflammation. L'inflammation pulmonaire réduirait la fonction respiratoire et les infections exacerbent le déclin de celle-ci (Eckrich et al., 2017).

b. Inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose

Dérégulation des transports ioniques

La dérégulation des transports ioniques est un des paramètres importants dans la mise en place de l'inflammation dans la mucoviscidose. Alors qu'une hypothèse spéculait que la composition saline jouait un rôle déterminant : hypertonique (Welsh, 1987), c'est l'hypothèse spéculant que la dérégulation des transports ioniques était due à un défaut d'hydratation qui fut retenue : isotonique (Boucher, 1994a; Boucher, 1994b).

Pourtant une analyse de la composition ionique du liquide de surface des VA de souris *cftr* (-/-) comparée à des souris sauvages par analyses aux rayons X montre une augmentation significative des ions Na^+ et Cl^- dans le liquide de surface des souris *cftr* (-/-) (Kozlova et al., 2005). Chez des patients CF, des concentrations plus élevées d'ions Na^+, Cl^- et K^+ dans le liquide de surface nasal sont retrouvées comparés aux sujets sains (Kozlova et al., 2006; Vanthanouvong et al., 2006). Ces résultats vont donc en défaveur du modèle isotonique.

Mais le volume du liquide des VA est le résultat d'un équilibre entre la quantité de fluide sécrété et absorbé. L'absence de CFTR entraîne une levée de l'inhibition d'ENaC et par conséquent une augmentation de l'absorption de Na^+ (Myerburg et al., 2006), compensée alors par une augmentation de l'absorption d'eau par les cellules épithéliales (Boucher, 2002; Matsui et al., 1998). L'hyperviscosité résultante représente un environnement favorable pour la colonisation par des micro-organismes (Smith et al., 1996). Le mucus déshydraté et visqueux inhiberait la migration des PNN et la phagocytose des bactéries dans les VA CF (Matsui et al., 2005). Les peptides antimicrobiens présents dans le mucus ne peuvent contrôler la croissance bactérienne et la formation des biofilms favorisant alors les cycles d'infection/inflammation (Perez-Vilar and Boucher, 2004) (figure 22). L'administration d'une solution hypertonique (7 %) à des patients CF (Donaldson et al., 2006; Elkins et al., 2006) permettrait la sécrétion d'eau par les cellules épithéliales et restaurerait le déficit en sels et en eau du liquide de surface des voies aériennes CF, favorisant alors la clairance mucociliaire (Donaldson et al., 2006; Wark et al., 2005) et diminuant donc le nombre d'épisodes pulmonaires infectieux. Les solutions hypertoniques réduiraient de manière variable les périodes d'exacerbation, amélioreraient la qualité de vie des patients à travers la fonction respiratoire (Tarran et al., 2007) et une étude a même montré qu'elles pouvaient réduire la motilité de certaines bactéries comme *P. aeruginosa* (Havasi et al., 2008). Cependant ce type de traitement est plutôt utilisé chez les patients CF australiens et non pas par les patients européens.

Aussi, il serait probable que les deux modèles co-existent caractérisés par une dérégulation locale de la concentration en ions, qui s'équilibrerait avec une augmentation de l'absorption en eau.

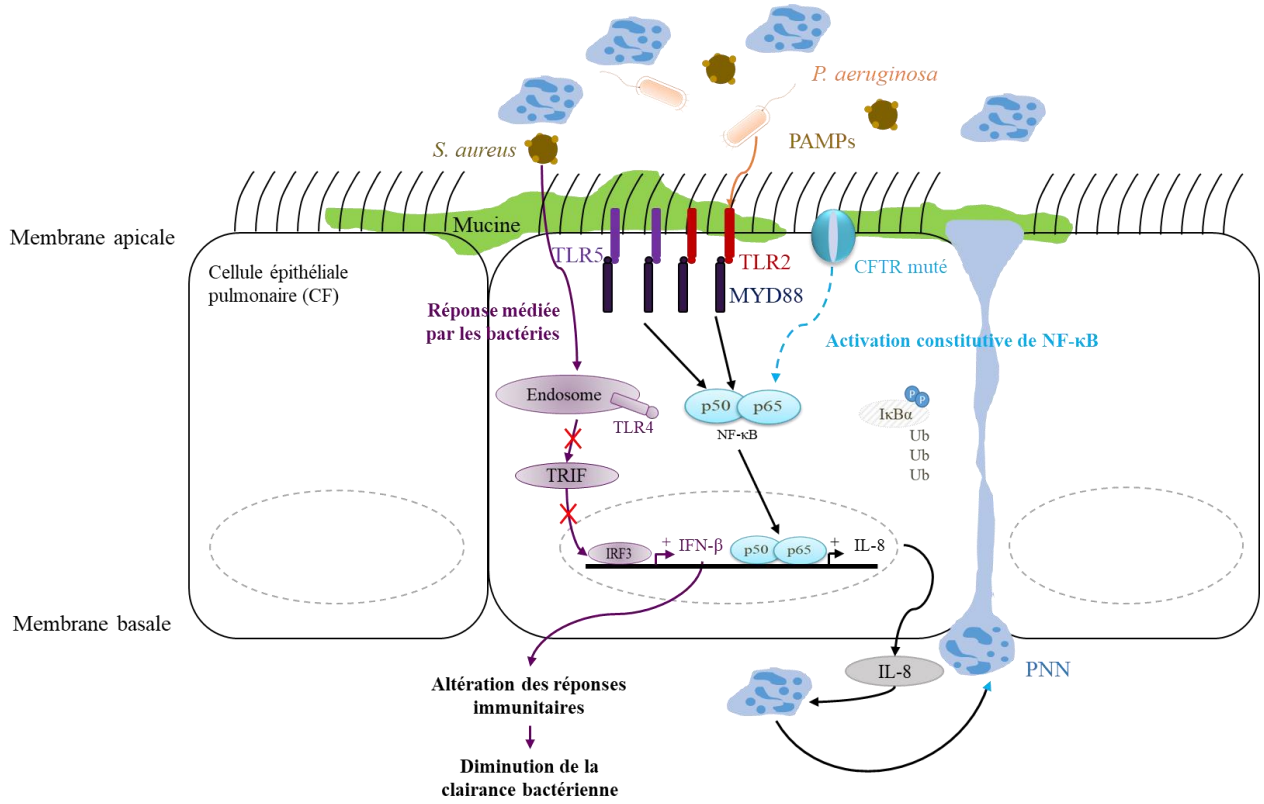


Figure 22 : L'inflammation dans la mucoviscidose. L'expression de TLR2 et TLR5 à la surface apicale est augmentée, alors que l'expression de TLR4 est limitée à l'endosome. Dans les cellules épithéliales des voies respiratoires CF, NF-κB (*Nuclear Factor-kappa B)* est activée de manière constitutive, ce qui entraîne la production de cytokines inflammatoires, telles que l'IL-8, et le recrutement de PNN indépendamment de l'interaction entre le TLR et la protéine adaptatrice MyD88. Après infection, les PAMPs bactériens augmentent encore l'activation de NF-κB par l'activation de la signalisation de TLR-MyD88. L'activation intracellulaire de TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*) à partir de l'endosome par TLR4 est altérée, ce qui empêche la translocation du facteur de régulation IRF3 (*Interferon Regulatory factor 3*) dans le noyau et l'activation des produits géniques de l'IFN (*InterFeroN*) de type I, nécessaires à l'activation des cellules dendritiques et à l'élimination de certains pathogènes liés à la mucoviscidose (Cohen and Prince, 2012b).

La défense antibactérienne

Les bactéries intactes sont rarement en contact direct avec les cellules épithéliales des voies aériennes protégées par des mucines, les bactéries sont évacuées par la clairance mucociliaire. Dans des conditions pathologiques, les composants de la paroi cellulaire bactérienne et les flagelles sont les principaux activateurs de la voie pro-inflammatoire épithéliale *via* les récepteurs TLR conduisant à l'inflammation des VA (Basu and Fenton, 2004). La mucine transmembranaire, MUC1/Muc1, exprimée de manière ubiquitaire dans la muqueuse des cellules épithéliales, supprime les réponses inflammatoires du poumon induites par *P. aeruginosa* ou la flagelline (Lu et al., 2006).

La résistance à l'infection pulmonaire chronique par *P. aeruginosa* exige une modulation de la libération de l'IL-1β *via* CFTR et de la signalisation à partir de son récepteur, un processus déficient dans les cellules CF (Reiniger et al., 2007).

Les neutrophiles

Les neutrophiles représentent ~ 60 % des leucocytes humains dans le sang, ayant une durée de vie assez courte (10-12 h) dont la principale fonction est de tuer les microorganismes directement par phagocytose, dégranulation ou explosion oxydative, et indirectement par le relargage de cytokines (TNF-α, IL-1β, CXC, IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-13) et de chimiokines (IL-8, IP-10, MIP-1α) (Yang et al., 2017) avec pour objectif final l'éradication des pathogènes. Il existe quatre types de granules neutrophiliques contenant des enzymes, des récepteurs et des substances antimicrobiennes nécessaires à l'éradication de l'infection.

Dans un contexte normal, les neutrophiles phagocytent les cellules étrangères ou infectées. Grâce à un gradient de substances chimio-attractantes, le neutrophile peut traverser l'endothélium et migrer dans le tissu vers sa cible : migration transendothéliale ou diapédèse (Mul et al., 2000; Rollins, 1997) (figure 23). Il peut reconnaître les LPS (LipoPolySaccharide) et polysaccharides de corps étrangers, les enrober, et les endocyter dans des endosomes spécifiques : les phagosomes. Les granules neutrophiliques vont fusionner avec ces phagosomes, libérer leur contenu pour permettre la lyse des pathogènes phagocytés (Lee et al., 2003a) par des sécrétions d'enzymes (myéloperoxydase, élastase…) et lorsqu'ils seront détruits, le neutrophile entre en « mort programmée » et sera phagocyté par les macrophages (Fadok et al., 2001; Kantari et al., 2008).

L'inflammation bronchique est une étape précoce, prolongée et sévère du développement de la mucoviscidose. Elle est caractérisée par un afflux massif de PNN (Dhooghe et al., 2014). Les PNN sont délétères car ils contribuent aux lésions des voies aériennes. Ils affluent en grand nombre sur le site inflammatoire, dus à une chémo-attraction de l'IL-8 sécrétée par les cellules épithéliales (McNally et al., 2011; Nakamura et al., 1992). Les PNN peuvent produire de nombreuses protéases (métalloprotéases, sérine-protéinases) menant à la dégradation des molécules de la matrice extracellulaire (MEC). L'élastase produite par les PNN dégrade des protéines telles que l'élastine, provoquant sur le long terme des bronchectasies (Sandhaus and Turino, 2013) mais elle peut aussi cliver les opsonines et les récepteurs nécessaires à la phagocytose des pathogènes aggravant l'infection existante (Konstan and Berger, 1997). L'élastase stimule aussi la production de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires, qui sont retrouvées à de fortes concentrations dans les LBA des patients CF (Balfour-Lynn et al., 1996; Bonfield et al., 1999). L'activité de l'élastase dans des neutrophiles issus de crachats corrèle avec la sévérité de l'atteinte pulmonaire des patients CF (Dittrich et al., 2018).

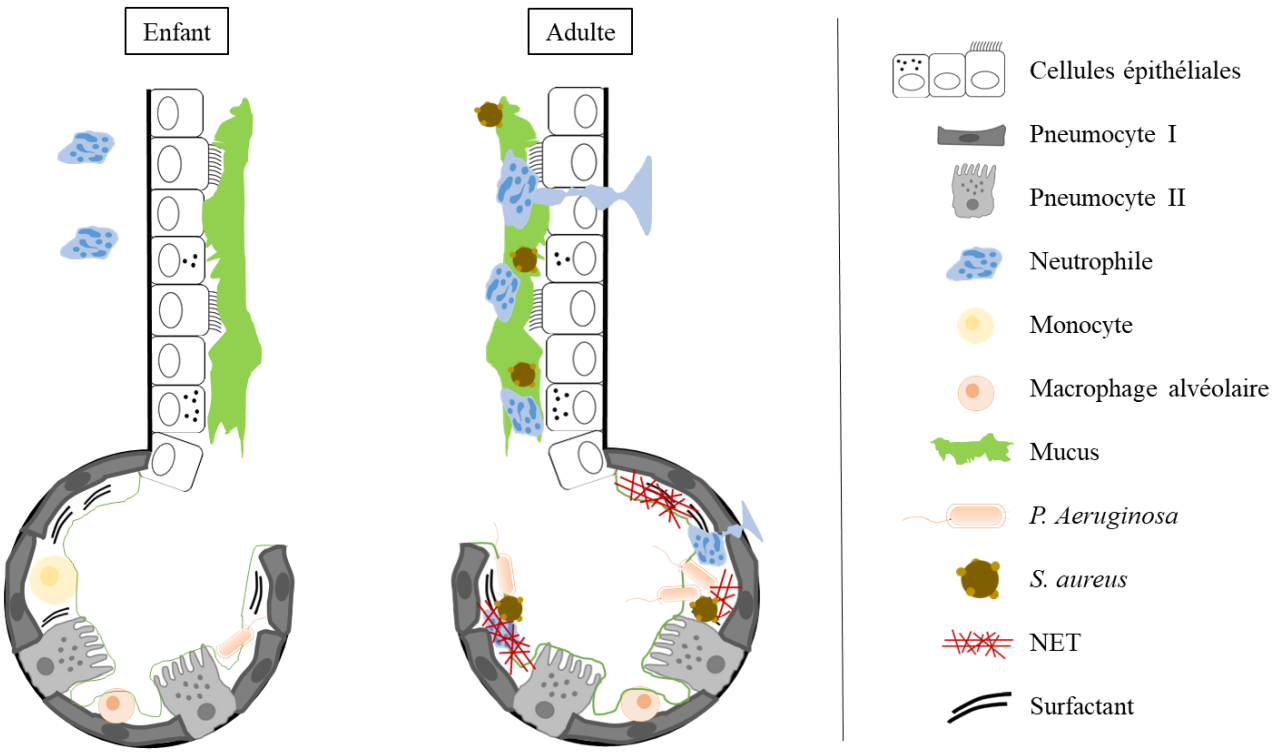


Figure 23 : Altération des voies respiratoires et formations de pièges extracellulaires neutrophiles (NET) dans les voies respiratoires CF. Au stade fœtal et dans la petite enfance, une inflammation neutrophilique au niveau des régions péri-bronchiques est présente chez les patients CF qui ont un excès de mucus et des sécrétions obstructives mais pas d'infections bactériennes persistantes. Ces anomalies des VA augmentent tout au long de l'enfance et incluent une inflammation des voies respiratoires inférieures. Lors de la progression de la maladie, divers composants microbiens, cytokines inflammatoires et médiateurs lipidiques induisent une NETosis. Les excédents de NET et leurs composants cytotoxiques, associés au mucus hypervisqueux, exacerbent la maladie (Khan et al., 2019).

Les neutrophiles circulants et présents dans les VA des patients CF présentent un profil d'expression génétique spécifique caractérisé par une augmentation de chimiokines (CCL17, CCL18) et de récepteurs à IL-8 et IL-10 (Adib-Conquy et al., 2008), une diminution de TLR2 dans les PNN sanguins CF par rapport aux non-CF, une augmentation de TLR4 dans les PNN des VA de patients CF (Petit-Bertron et al., 2008a), un taux cellulaire de glutathion réduit et une augmentation des marqueurs CD11b et CD66b dans les PNN des VA par rapport aux PNN sanguins CF (Tirouvanziam et al., 2008). Une accumulation de neutrophiles est retrouvée à la surface des cellules épithéliales CF ainsi que la présence de ROS, de protéase et une hypersécrétion d'élastase (Doring et al., 1986; Goldstein and Doring, 1986; Konstan et al., 1994; Suter et al., 1984; Taggart et al., 2000; Witko-Sarsat et al., 1999) favorisant la dégradation du parenchyme pulmonaire (Downey et al., 2009).

L'élastase des neutrophiles induit une surproduction de mucines (ex. : MUC5AC), et augmente la sécrétion en IL-8 par les cellules épithéliales (Voynow et al., 2008). L'activité protéolytique de l'élastase libre clive le récepteur de l'IL-8 (CXCR1, *C-X-C motif chemokine Receptor-1*) présent à la surface des PNN, altérant ainsi leur capacité à détruire les bactéries (Hartl et al., 2007; Hartl et al., 2008). L'IL-8 et les intermédiaires lipidiques soutiennent l'influx de PNN, le TNF-α et l'IL-1β augmentent les réponses neutrophiliques à la chémoattraction et le TNF-α stimule les activités d'explosion oxydative et sécrétrices pro-inflammatoires des PNN (Eckrich et al., 2017; Montgomery et al., 2018; Taylor et al., 2016; Verhaeghe et al., 2007a).

L'interaction des PNN CF avec les cellules épithéliales CF réduit leur niveau d'apoptose par rapport à une interaction avec des cellules épithéliales non-CF (Tabary et al., 2006b). Les VA CF contiennent une fraction significative de PNN viables non apoptotiques (Tirouvanziam et al., 2008). Les biomarqueurs métabolomiques d'une inflammation neutrophilique chez les patients CF sont l'hypoxanthine, l'hypoxie (lactate) et le stress oxydatif (diminution du ratio de glutathion oxydé/réduit) (Esther et al., 2015; Esther et al., 2016).

La mort des PNN est la principale source d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) qui contribue à l'épaississement des expectorations en augmentant ainsi la viscosité du mucus et la quantité d'oxydase (Henke and Ratjen, 2007). L'activation de la sécrétion de mucus par l'élastase contribuerait à accentuer le défaut de la clairance mucociliaire aggravant l'obstruction bronchique et entraînant un défaut d'évacuation des pathogènes présents dans les VA des patients CF (Berger, 2002).

De plus, les voies respiratoires des patients CF sont exposées aux radicaux oxygénés générés par la réponse immunitaire exagérée (Cohen-Cymberknoh et al., 2013). Le stress oxydatif résultant augmente la détérioration/dégradation pulmonaire menant à la bronchectasie. La capacité de l'élastase à pouvoir cliver le récepteur à la phosphatidylserine, interférant avec les mécanismes de l'apoptose, amplifie aussi le processus inflammatoire (Vandivier et al., 2002).

La persistance des PNN contribue aux lésions de l'épithélium des VA, à l'inflammation et à l'altération de la clairance mucociliaire.

La dérégulation de la balance de cytokines pro-/anti-inflammatoires

L'inflammation pulmonaire est caractérisée par des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires : IL-1β, IL-6, TNF-α (Sagel et al., 2007) et IL-8 (Muhlebach and Noah, 2002; Muhlebach et al., 2004; Sagel et al., 2007). L'excédent de cytokines pro-inflammatoires libérées à la surface de l'épithélium des VA pourrait faciliter la prolifération bactérienne (Meduri et al., 1999).

Les taux élevés d'IL-8 pourraient être dus à une sécrétion augmentée et constitutive d'IL-8 par les cellules épithéliales bronchiques humaines CF, en absence de stimulus (Carrabino et al., 2006; Eidelman et al., 2001; Hallows et al., 2006; Tabary et al., 1998) ou en présence de stimuli (DiMango et al., 1998; Joseph et al., 2005; Kube et al., 2001; Tabary et al., 1999a; Tabary et al., 2003) entretenant alors un contexte pro-inflammatoire par le recrutement de PNN, sécrétant eux-mêmes de l'IL-8 (Boncoeur et al., 2008a).

L'IL-8 est le principal chimio-attractant des PNN dans les poumons CF. Sa synthèse se fait par différents types cellulaires des VA dont les PNN, les macrophages alvéolaires, les fibroblastes et les cellules épithéliales bronchiques. Les macrophages alvéolaires produisent de l'IL-8 aussi bien en réponse au LPS des bactéries qu'à des stimuli autocrines tels que le TNF-α et l'IL-1β. Bien que la source exacte des taux élevés d'IL-8 au niveau des bronches et des bronchioles CF soit difficilement identifiable, des études suggèrent un rôle primordial des cellules épithéliales bronchiques. Ces cellules sécrètent plus d'IL-8 et d'IL-6 chez les patients CF que les sujets sains permettant ainsi d'en détecter les niveaux (Bonfield et al., 1999; Tabary et al., 2003).
Des résultats similaires ont été trouvés pour des glandes séreuses trachéales en condition basale (Kammouni et al., 1997), pour une lignée cellulaire épithéliale trachéale en réponse à une stimulation par *P. aeruginosa* avec en plus une augmentation de GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-colony Stimulating Factor*) (Kube et al., 2001) mais également de mucines et du récepteur ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) pour des cellules épithéliales bronchiques CF en réponse à *P. aeruginosa* (DiMango et al., 1998; Joseph et al., 2005; Tabary et al., 2006b) ou en réponse au TNF-α (Becker et al., 2004; Venkatakrishnan et al., 2000), pour des glandes sous-muqueuses pour les niveaux d'IL-8 mais pas concernant l'IL-6 ni l'IL-1β (Tabary et al., 1999a; Tabary et al., 1998).

Des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8) ont été retrouvés dans le sérum de patients CF (Knutsen and Mueller, 1990; Suter et al., 1989) et dans des LBA CF (Muhlebach and Noah, 2002; Nakamura et al., 1992; Osika et al., 1999; Suter et al., 1989). Le passage transendothélial et l'affluence accrue des PNN et des macrophages provoquent à l'encontre des bactéries présentes, la synthèse de cytokines, de TNF-α et d'IL-1β qui induisent la production de molécules pro-inflammatoires par les cellules épithéliales, empruntant une voie d'activation autre que celle initiée par les bactéries.

Lors des étapes de régénération, suite à des lésions de l'épithélium respiratoire, il existe une modulation spatio-temporelle de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-8 et des métalloprotéases matricielles (MMP)-9 et MMP-7 (Hajj et al., 2007; Puchelle et al., 2006). Au cours de la phase initiale d'étalement et de migration cellulaire, interviennent de façon majeure les composants de la MEC et les récepteurs de types intégrines, les protéines vésiculaires telles que la cellubrévine, ainsi que les MMP, leurs inhibiteurs, des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance, dont le rôle spécifique dans la re-différenciation et la reconstitution complète de l'épithélium respiratoire a été peu décrit.

La surproduction des cytokines pro-inflammatoires observée dans les poumons des patients CF pourrait être due tant au dysfonctionnement des systèmes de contrôle modulant l'infiltration qu'à la régénération retardée de l'épithélium (Ribeiro et al., 2005; Wiszniewski et al., 2006).

La sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, normalement produite de manière constitutive par les cellules bronchiques chez les sujets sains, est diminuée voire absente des cellules épithéliales bronchiques CF (Bonfield et al., 1995; Osika et al., 1999) et des lymphocytes CF (Moss et al., 1996) et serait aussi responsable de l'afflux massif de PNN et de la persistance de l'inflammation dans les VA (Chmiel et al., 2002).
Des souris invalidées pour l'IL-10 présentent une réponse inflammatoire prolongée suite à une stimulation bactérienne associée à une infiltration neutrophilaire exagérée dans les poumons (Bonfield et al., 1999; Bonfield et al., 1995; Moss et al., 1996). La chimiokine RANTES (*Regulated upon Activation Normal T cells Expressed and Secreted*), inducteur de la chimiotaxie des éosinophiles, monocytes et lymphocytes T mémoires, a été retrouvée plus faiblement exprimée chez des patients CF que chez des patients asthmatiques (Koller et al., 1997). La stimulation de RANTES par l'IL-1β ou le TNF-α est plus forte dans des cellules bronchiques normales que dans des cellules CF (Kube et al., 2001). Bien que ces résultats n'aient pas toujours été reproduits (Becker et al., 2004; Tabary et al., 2001), il semblerait que l'absence d'induction de RANTES par les cellules CF jouerait un rôle dans la chimiotaxie des lymphocytes pulmonaires CF.

c. Les voies de signalisation impliquées dans l'inflammation

La transduction du signal est essentielle dans divers processus cellulaires et moléculaires comme la croissance cellulaire, la prolifération, le métabolisme et l'expression des gènes. Dans la mucoviscidose, plusieurs voies de signalisation sont altérées (tableau 3).

Une dysfonction de CFTR entraîne un défaut de la voie de signalisation NF-κB et donc une inflammation caractérisée par une invasion de neutrophiles.
NF-κB régule l'expression de gènes pro-inflammatoires comme les cytokines et chimiokines, et par conséquent joue un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire. Dans la mucoviscidose, la voie de signalisation NF-κB est suractivée, impliquant que la dysfonction de CFTR est la cause de cette dérégulation. La suractivation de cette voie corrèle avec une augmentation de l'expression d'IKK (*Inhibitor of nuclear factor Kappa B Kinase*) et de l'activité d'AP-1 (*Activator Protein 1*). La voie des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) est aussi dérégulée dans la mucoviscidose (Sadikot et al., 2004).

SYSTEME IMMUNITAIRE		
GENES	NOM DES GENES	VOIES DE SIGNALISATION
CTSB	*Cathepsine B*	Système immunitaire inné (SII), Infections bactériennes des voies aériennes CF
CXCL1	*C-X-C motif chemokine Ligand 1*	Réponses inflammatoires, immunitaires et cytokines
CXCL10	*C-X-C motif chemokine Ligand 10*	Cytokines circulantes, Signalisation par les interleukines
CXCL8	*C-X-C motif chemokine Ligand 8*	NF-κB, SII, Interleukines circulantes
GHR	*Growth Hormone Receptor*	SII, Cytokines circulantes
HMOX1	*HeMe Oxygenase 1*	NF-κB, SII, Cytokines circulantes
ICAM1	*InterCellular Adhesion Molecule 1*	Cytokines circulantes, Signalisation par les interleukines
IL1A	*Interleukine 1 α*	NF-κB, Signalisation par le récepteur des cellules T, Réponses IFN α et β
IL1B	*Interleukine 1 β*	Réponses immunitaires, Cytokines circulantes et fibrose pulmonaire
IL6	*Interleukine 6*	Réponses immunitaires, Cytokines circulantes
ITGA4	*InTeGrin subunit α 4*	Régulation transcriptomique par RUNX3 (*RUNX Family Transcription Factor 3*), Transcription génétique
LY96	*LYmphocyte antigen 96*	NF-κB, SII
MME	*Membrane MetalloEndopeptidase*	Voies de développement des cellules B, SII
MMP1	*Matric MetalloPeptidase 1*	Cytokines circulantes, Réponses immunitaires
NOX4	*NADPH Oxidase 4*	Transmigration des cellules immunitaires, Voie *p21-activated protein kinase*
PTGS2	*ProsTaGlandin-endoperoxidase Synthase 2*	NF-κB, Cytokines circulantes, SII
RASGRP1	*RAS Guanyl Releasing Protein 1*	Signalisation par les récepteurs des cellules T, Cytokines circulantes
SERPINA1	*SERPIN family A member 1*	SII, Fibrose pulmonaire
TLR4	*Toll-Like Receptor 4*	NF-κB, SII, Signalisation par TREM1 (*Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells*)
VEGFA	*Vascular Endothelial Growth Factor A*	SII, Signalisation par les interleukines

Tableau 3 : Voies de signalisation altérées dans la mucoviscidose et gènes associés (Ideozu et al., 2019).

Voie NF-κB

NF-κB (ou Rel/NF-κB) est une famille de facteurs de transcription nucléaire qui joue un rôle prépondérant dans l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (figure 24). Son activation est sous la dépendance de stimuli d'origine inflammatoire (cytokines pro-inflammatoires, radicaux libres oxygénés) ou infectieuse (bactéries, virus). NF-κB régule la synthèse de cytokines, chimiokines, de molécules d'adhésion, de facteurs de croissance, d'enzymes ; contrôle la prolifération cellulaire et l'apoptose (Neumann and Naumann, 2007).

NF-κB est un dimère composé de deux des cinq protéines composant cette famille : p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 (NF-κB1) et p52 (NF-κB2) (Baeuerle and Henkel, 1994). Ces cinq protéines possèdent un domaine appelé RHD (*Rel Homology Domain)* qui permet la formation de dimères, la liaison à l'ADN et la localisation nucléaire ainsi que l'interaction avec les inhibiteurs de NF-κB. Mais seuls, p65, c-Rel et RelB possèdent un domaine de transactivation. En condition basale, NF-κB est séquestré dans le cytoplasme de la cellule par un complexe protéique inhibiteur, IκB, composant une famille au nombre de huit (IKKα, IKKβ, IKKγ/NEMO (*NF-κB Essential MOdulator*), IKKε, IKKζ, Bcl-3, p100 et p105) caractérisé par des répétitions ankyrines au niveau de l'extrémité C-terminale. Suite à une stimulation le complexe protéique IκB inhibiteur est phosphorylé et dégradé par le protéasome, NF-κB peut alors transloquer dans le noyau pour réguler l'expression de nombreux gènes cibles (Hayden and Ghosh, 2004).

- La voie classique dépend d'IκB et concerne principalement le dimère p50/p65 lié à l'inhibiteur IκBα.

Elle est induite par de multiples médiateurs de la réponse innée et adaptative comme les cytokines pro-inflammatoires (TNF-α et IL-1β), les TLR et les récepteurs d'antigènes (*T Cell Receptor*, *B Cell Receptor*), de multiples voies de signalisation intracellulaires sont activées et convergent par le biais de phosphorylations en cascade vers le complexe IKK (α, β, γ). Une fois phosphorylé, ce complexe va phosphoryler IκBα au niveau des résidus sérines (S32 et S36) entraînant la polyubiquitination d'IκBα au niveau des deux lysines adjacentes et sa dégradation par le protéasome.

Le dimère p50/p65, ainsi libéré, va transloquer dans le noyau et se lier au niveau de séquences consensus pour activer la transcription de gènes cibles (cytokines, molécules d'adhésion, inhibiteur de l'apoptose, métabolisme oxydatif) (Bonizzi and Karin, 2004; Yamamoto and Gaynor, 2001).

- La voie alternative, indépendante d'IκB, concerne le dimère p52/RelB.

Son précurseur, situé dans le cytoplasme sous forme du dimère p100/RelB, est phosphorylé par IKKα pour donner la forme active du dimère p52/RelB. Seuls certains stimuli tels que le LPS, le virus d'Epsein-Barr ou la lymphotoxine-β induisent l'activation de NF-κB *via* cette voie et les gènes activés ne sont pas liés à l'inflammation.

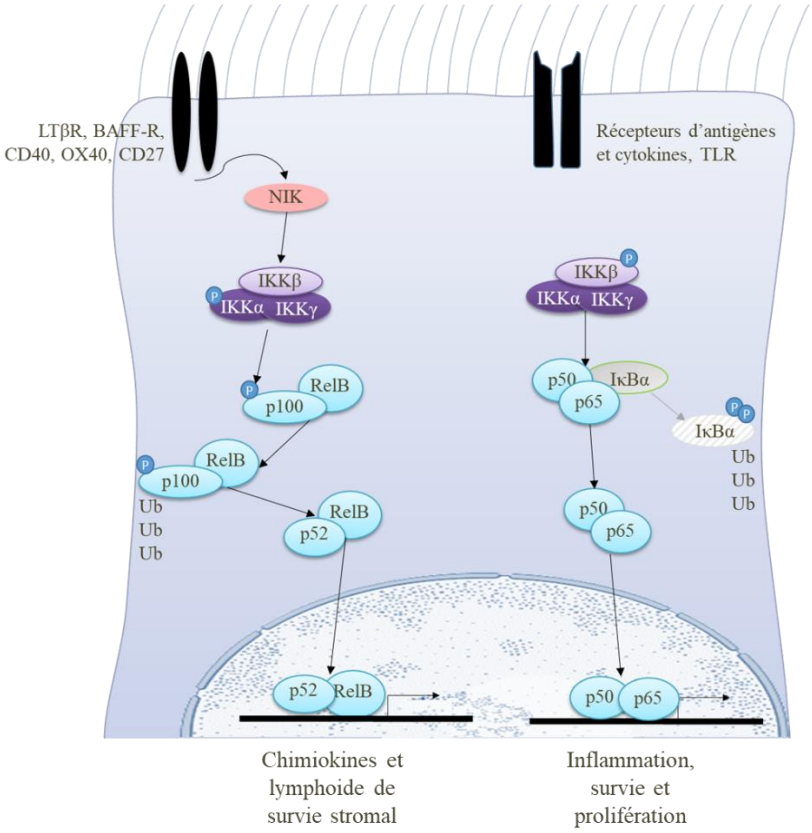


Figure 24 : Schéma des deux voies de signalisation NF-κB.

Découverte pour la première fois en 1986 (Sen and Baltimore, 1986), NF-κB a par la suite été décrite comme simple facteur de transcription intervenant dans la réponse inflammatoire de cellules épithéliales pulmonaires CF stimulées par *P. aeruginosa* (Li et al., 1998). L'activation constitutive et excessive de cette voie de signalisation dans des lignées cellulaires (DiMango et al., 1998) et cultures primaires de cellules bronchiques issues de patients CF (Tabary et al., 1999a) a appuyé le statut d'inflammation intrinsèque dans la mucoviscidose.

En effet, l'accumulation de la protéine CFTR dans le RE crée un état de stress activant NF-κB. Cette hyper-activation a été associée à une hypersécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*) (Chirico et al., 2015) et d'IL-8, de chimiokines et molécules d'adhésion (Pollard et al., 2005; Scheid et al., 2001; Srivastava et al., 2006; Tabary et al., 1999a; Tabary et al., 2001; Tamanini et al., 2003; Verhaeghe et al., 2007b) par les cellules des VA CF (Carrabino et al., 2006; Saadane et al., 2007; Saadane et al., 2006; Tabary et al., 1999a; Venkatakrishnan et al., 2000) et à l'absence de la protéine CFTR fonctionnelle ou la présence de la protéine mutée (Perez et al., 2007; Weber et al., 2001).

De plus, les PAMPs activent la signalisation de TLR-MyD88 et augmentent ainsi celle de la voie NF-κB (Muir et al., 2004). HMGB1 *via* son propre récepteur RAGE (*Receptor for Advanced Glycation Endproducts*) augmente l'expression des cytokines pro-inflammatoires, qui favorisent la production de TLR2 et 4 (Chirico et al., 2015).

L'activation de TLR4 prévient la translocation d'IRF3 et donc la synthèse de gènes tels que l'*IFN1*, requis pour l'activation des cellules dendritiques et la clairance des pathogènes relatifs à la mucoviscidose (Cohen and Prince, 2012b).

La diminution de l'expression de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire aidant à préserver la fonction d'IκB, entraîne une dérégulation de l'activité de la voie NF-κB dans les épithélia provoquant alors une production excessive et prolongée de médiateurs de l'inflammation (Chmiel and Konstan, 2005) (Chmiel et al., 1999).

L'activation constitutive de NF-κB apparaît donc comme une étape clé de l'inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose.

Voie MAPK

Les MAPK forment une famille de sérine/thréonine kinases jouant un rôle essentiel dans la transduction du signal, en régulant la transcription de gènes en réponse à des modifications de l'environnement extracellulaire. Ce système est conservé à travers l'évolution, puisqu'il est retrouvé chez l'Homme, les plantes, les champignons, les nématodes, les insectes ou les levures. Les MAPK contrôlent des fonctions cellulaires telles que la prolifération, la migration, la différenciation et l'apoptose et participent aux mécanismes de réponse cellulaire liés au stress, à l'inflammation ou à l'infection. Les onze membres sont regroupés en six groupes de MAPK qui ont été identifiés selon leur homologie de séquence. Les trois principaux sont les voies ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) 1/2, p38 et JNK (*c-Jun NH2-terminal Kinase*). Les membres de chaque groupe s'activent par des phosphorylations en cascade sur trois niveaux (MAPKKK, MAPKK, MAPK) ; elles vont ensuite transloquer et permettre la transcription de gènes cibles (Turjanski et al., 2007).

La nature des stimuli extracellulaires et du type cellulaire concerné va déterminer la localisation, l'intensité et la durée de l'activation de chacune des MAPK. Par exemple, les voies p38 et JNK seront préférentiellement activées à la suite d'un stress cellulaire, alors que la voie ERK1/2 sera plutôt activée par les facteurs de croissance.

Les voies ERK1/2 et p38 sont impliquées dans la régulation de l'IL-8 dans des cellules épithéliales pulmonaires stimulées par une solution hyperosmotique (Loitsch et al., 2000), des peptides de PNN (Syeda et al., 2008b), du TNF-α (Chandru and Boggaram, 2007) ou certaines bactéries (Slevogt et al., 2006) ; dans des monocytes CF stimulés par du LPS de *E. coli* (Zaman et al., 2004) ; dans des lignées de cellules épithéliales pulmonaires normales, de macrophages ou de souris stimulées par *P. aeruginosa* ou *B. cepacia* (Bozinovski et al., 2002; Pollard et al., 2004; Reddi et al., 2003).

La voie JNK parait être impliquée dans la régulation de l'IL-8 suite à un stress induit par la nicotine (Tsai et al., 2006), les peptidoglycanes de *S. aureus* (Cheon et al., 2008) et *S. pneumoniae* (Schmeck et al., 2006) ou encore par des particules présentes dans l'air ambiant, comme les particules de zinc (Kim et al., 2006). Une stimulation par de l'ADN de *P. aeruginosa* ou du TNF-α active la sécrétion de l'IL-8 selon un mécanisme p38 dépendant (Blau et al., 2007; Delgado et al., 2006) mais une stimulation par des asialoGM1 ou un stress oxydant active la sécrétion selon un mécanisme ERK1/2 dépendant (Boncoeur et al., 2008a; Li et al., 2003).

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de NF-κB et ERK1/2, p38, dans des cellules épithéliales bronchiques CF, montre une diminution faible de la sécrétion en IL-8 mais en combinaison, un blocage complet est observé. Il existe donc un cross-talk/relais entre les voies NF-κB et MAPK (Muselet-Charlier et al., 2007b). Une plus forte phosphorylation des protéines ERK1/2 dans une lignée cellulaire trachéale fœtale CF a été observée par rapport à des cellules normales ainsi qu'une augmentation de l'activation du facteur de transcription AP-1 agissant en aval de ces MAPK (Verhaeghe et al., 2007b).

Même si peu de données sur l'implication des différentes voies des MAPK sont disponibles dans la littérature et qu'elles diffèrent en fonction du type cellulaire, elles soulignent l'importance de ces voies de signalisation en plus de la voie NF-κB dans l'inflammation des voies aériennes CF.

Voie PI3K

La PI3K (*Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase*) est une enzyme constituée d'une sous-unité régulatrice (p85, contenant deux domaines de recrutement SH2) associée à une sous-unité catalytique (p110). Elle est recrutée au niveau d'un récepteur dont les tyrosines sont phosphorylées, *via* ses domaines SH2, et va phosphoryler les phosphatidyl-inositol diphosphates membranaires (PIP_2) en phosphatidyl-inositol triphosphates (PIP_3), point de départ de l'activation d'autres cascades de signalisation cellulaire.

La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR est importante pour la régulation du cycle cellulaire avec l'activation cruciale de mTOR pour la régulation de l'autophagie cellulaire (Glick et al., 2010; Reilly et al., 2017). Les voies mTORC1/2 (*mechanistic Target Of Rapamycin Kinase*) et EIF (*Eukaryotic Initiation Factor*) interagissent avec CFTR, aussi lorsque mTOR est activé dans les cellules épithéliales bronchiques CF, la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR est inhibé dans la mucoviscidose. L'inhibition de cette voie entraîne une augmentation de l'expression et de la stabilité de CFTR. Cette kinase, PI3K, est entre autre activée par l'IL-1β, par l'interaction directe entre la sous-unité régulatrice et le récepteur IL-1 *Receptor 1* (IL1R1) (Marmiroli et al., 1998) conduisant à l'activation des protéines kinases B (Akt) et finalement à NF-κB et AP-1 (Reddy et al., 1997; Sizemore et al., 1999). Cette voie pourrait être impliquée dans l'expression de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-8 (Funakoshi et al., 2001; Newcomb et al., 2005; Syeda et al., 2008a).

L'activité de CFTR en partie régulée par les récepteurs β2-adrénergiques, serait dépendante de la cascade de signalisation impliquant les PI3K et la voie ERK1/2 (Robay et al., 2005).

Voie calcique

Le calcium peut agir sur la transduction de signaux intracellulaires après un afflux venant de l'activation de certains canaux, mais peut aussi agir en tant que second messager pouvant réguler différentes protéines de voies de signalisation intracellulaire. Il intervient dans différentes fonctions physiologiques telles que la contraction musculaire ou la motilité cellulaire. La concentration basale de Ca^{2+} dans le cytoplasme est de 10-100 nM, maintenu grâce au stockage par des pompes de celui-ci dans le RE et les mitochondries. Certaines protéines du cytoplasme et organites ont aussi la faculté de pouvoir se lier au Ca^{2+} et agissent comme des tampons. L'exposition de cellules à certains stimuli provoque une libération rapide du Ca^{2+} (mobilisation des stocks et influx) augmentant ainsi la concentration intracellulaire libre (Ichikawa and Kiyohara, 2001; McNeil et al., 1985; Takuwa et al., 1995).

Il existe un lien entre la mobilisation du calcium intracellulaire et la réponse inflammatoire dans plusieurs systèmes cellulaires (Fu et al., 2007; Jefferson et al., 1999; Lilienbaum and Israel, 2003).
Dans le contexte de la mucoviscidose, la régulation de la mobilisation du calcium comme second messager est mal compris (Mall et al., 2003). Les agents pathogènes tels que *P. aeruginosa* induisent une sécrétion d'IL-8 par l'intermédiaire du calcium dans les cellules épithéliales des VA (Ratner et al., 2001). Un traitement avec des inhibiteurs des pompes calciques restaure le potentiel nasal chez les souris *F508del-cftr* et la protéine CFTR mutée F508del à la membrane plasmique sur des cultures cellulaires (Egan et al., 2002).

Le lien possible entre les stocks de Ca^{2+} intracellulaire et la protéine CFTR a émergé de plusieurs études réalisées sur des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques CF mutées F508del, démontrant qu'une accumulation de protéines mal repliées provoque une concentration élevée de Ca^{2+} intracellulaire (Pahl and Baeuerle, 1996) et induit une réponse inflammatoire plus importante au niveau de l'épithélium CF par rapport à celle observée sur les cellules épithéliales bronchiques normales (Ribeiro et al., 2005). Une thérapie visant à maintenir un faible niveau de Ca^{2+} intracellulaire permet de corriger le défaut de la voie de biosynthèse endogène de la protéine CFTR dans les cellules épithéliales des VA humaines (Antigny et al., 2008a; Norez et al., 2006). Le stress du RE pourrait être capable d'activer NF-κB sans stimulus bactérien (Weber et al., 2001) et la bradykinine, un médiateur de l'inflammation pourrait augmenter la mobilisation calcique et permettre la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Le Ca^{2+} a par la suite été montré comme étant un régulateur clé de l'activation de NF-κB dans des cellules épithéliales des VA CF (Tabary et al., 2006a) sans que les liens directs ne soient démontrés.

La protéine CFTR, NF-κB et la mobilisation du Ca^{2+} sont interdépendantes : la thapsigargine, un bloqueur de la pompe calcique ATPase/SERCA (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase*), peut augmenter l'activation de NF-κB et le BAPTA-AM (*1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N, N, N, N'-tetraacetic acid-AcetoMethyl*), un chélateur calcique peut inhiber NF-κB (Ratner et al., 2001). La correction de l'un de ces facteurs pourrait rétablir la plupart des paramètres dérégulés dans l'épithélium pulmonaire CF.

« Cross-talk » des voies de signalisation

Une stimulation par *P. aeruginosa* et de la flagelline peut augmenter la $[Ca^{2+}]_i$ et l'activation de la voie NF-κB (McNamara et al., 2006). Le lien entre le Ca^{2+} et NF-κB a été démontré dans des cellules T (Truneh et al., 1985), des lymphocytes B (Dolmetsch et al., 1998), des neurones (Lilienbaum and Israel, 2003), des PNN humains (Kelher et al., 2003) et dans une lignée épithéliale bronchique humaine (Tabary et al., 2006a). Mais une stimulation par les souches PAO1 et PAK (*P. aeruginosa*) active NF-κB et par conséquent la synthèse de l'IL-8 dans des cellules JME/CF15 et Calu-3 sans affecter les concentrations $[Ca^{2+}]_i$ (Hybiske et al., 2004; Jacob et al., 2002). Une stimulation par des agonistes purinergiques, tels que la bradykinine ou la thapsigargine, est suffisante pour produire une augmentation de l'activation de NF-κB mais ces modulations calciques ne sont pas nécessaires pour activer les voies de signalisation inflammatoires induites par *P. aeruginosa* ou par la flagelline dans les cellules épithéliales des voies respiratoires. De plus, il n'est pas connu que la signalisation *via* les TLR puisse induire une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ au niveau pulmonaire. Cependant un traitement de mobilisation de calcium agit en tant que co-signal pour l'induction de la sécrétion de l'IL-12 médiée par les TLR dans les cellules dendritiques murines dérivées de la moelle osseuse (Huang et al., 2017).

Le Ca^{2+} peut aussi activer la voie des MAPK, comme démontré par l'utilisation de thapsigargine ou d'ionomycine alors que l'activation de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), un stimulateur potentiel de la voie des MAPK, est indépendante du Ca^{2+} (Chao et al., 1992). Dans des cellules endothéliales veineuses et dans des PNN, il a été montré que cette activation serait liée à la modulation d'ERK1/2 (Fleming et al., 1995) par le PAF (*Platelet Activating Factor*) (Chen et al., 2005) et de p38 (Elzi et al., 2001).

d. Rôle de CFTR dans l'inflammation

Les effets des mutations de CFTR sur les cellules du système immunitaire ont été décrits pour les PNN (Morris et al., 2005), les macrophages (Van Goor et al., 2006), les lymphocytes (Moss et al., 2000) et les cellules dendritiques (Xu et al., 2009). Mais la première ligne de défense des VA est représentée par les cellules épithéliales pulmonaires.

L'activité anti-inflammatoire intrinsèque de CFTR spécule que l'inflammation exacerbée serait due à une diminution de la présence de la protéine CFTR sauvage à la membrane apicale des cellules épithéliales CF (Bodas and Vij, 2010; Hunter et al., 2010).

L'utilisation de l'inh172 (inhibiteur spécifique de l'activité du canal CFTR) contribue à augmenter de 30 % l'activité de la voie pro-inflammatoire dépendante de NF-κB alors que l'augmentation pharmacologique de l'AMPc la diminue de 25 %. Parallèlement, lorsque CFTR est inhibé, une augmentation de la sécrétion en IL-8 est observée. Ces expériences montrent qu'il est possible d'orienter des cellules saines vers un phénotype CF en modulant ces paramètres (Hunter et al., 2010; Perez et al., 2007; Vij et al., 2009) et que la présence de CFTR à la membrane apicale des cellules est nécessaire au contrôle de l'inflammation. En effet, une dysfonction de CFTR s'accompagne d'une dérégulation de la voie de signalisation induite par le TNF-α, et plus particulièrement des tyrosines kinases de la famille Src (Huang et al., 2003). De plus, CFTR interagit avec le récepteur de la cytokine TNF-α, TNFR1, dans des radeaux lipidiques, pouvant expliquer son activité de modulateur de la voie NF-κB et donc son rôle dans la sécrétion en IL-8 (Dudez et al., 2008).

L'activité pro-inflammatoire est illustrée par la présence de la protéine CFTR F508del mal repliée et s'accumulant dans le RE, où elle va induire un stress qui contribuera à l'activation endogène de la voie NF-κB (Rottner et al., 2009; Weber et al., 2001).
En condition de stress du RE, trois voies de signalisation peuvent être activées afin de diminuer la synthèse de nouvelles protéines et d'augmenter la dégradation des protéines anormales :

1) La voie UPR (*Unfolded Protein Response*) : augmente la capacité de repliement, de maturation et réduit la synthèse protéique et la transcription des protéines chaperonnes (Kitamura, 2011; Zhang et al., 2006).
2) La voie ERAD (*ER-Associated Degradation*) : élimine les protéines mal repliées par la voie ubiquitine protéasome (Gelman et al., 2002).
3) La voie EOR (*EROverload Response*) : si les deux autres sont insuffisantes, elle participe à l'activation de l'expression des gènes de l'inflammation et du système immunitaire aboutissant à l'apoptose cellulaire (Lai et al., 2007).

Dans les cellules CF, mutées F508del, on retrouve une augmentation de la voie UPR (Bartoszewski et al., 2008; Kerbiriou et al., 2007) et les protéines mutées accumulées dans le RE vont aussi interagir avec des protéines chaperonnes Ca^{2+}-dépendantes, modifiant ainsi l'homéostasie calcique et générant un stress supplémentaire contribuant au phénomène d'inflammation exacerbée (Antigny et al., 2008b; Knorre et al., 2002; Rab et al., 2007; Rottner et al., 2009).

Bien que l'origine de l'inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose reste débattue, sa dérégulation et son exacerbation restent majoritairement reconnues, avec notamment l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires, l'hyperviscosité et les dérégulations des voies de signalisation liées à ce processus.

L'inflammation qui constitue l'une des premières lignes de défense de l'organisme face à une agression extérieure, sature les systèmes de régulation physiologique, provoquant une dégradation progressive du parenchyme pulmonaire et par conséquent de la fonction respiratoire des patients CF. Réguler cette inflammation représente un des objectifs thérapeutiques de la mucoviscidose.

7. Stratégies thérapeutiques

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour cette pathologie. Les traitements symptomatiques permettent d'améliorer la prise en charge de la maladie et d'augmenter l'espérance de vie des patients.

1) Prise en charge de l'atteinte digestive, pancréatique, hépatobiliaire et osseuse

Dans le cadre d'une atteinte digestive, l'alimentation hypercalorique est recommandée avec 120-150 % des apports quotidiens journaliers. Tout en restant adaptée au goût de l'enfant, celui-ci devra ingérer ~ 10-15 % de protéines, ~ 45-65 % de graisses (graisses végétales à privilégier) et ~45-55 % de glucides. Dans certains cas, la supplémentation par une assistance nutritionnelle est nécessaire, en plus d'une hydratation plus importante et d'une supplémentation en sel en cas de forte chaleur.

Dans le cadre d'une atteinte pancréatique, la prise en charge diffèrera selon l'origine exocrine ou endocrine. Pour une atteinte exocrine, des extraits pancréatiques de lipase sont prescrits, dont l'efficacité peut être potentialisée en cas de besoin par de l'oméprazole (inhibiteur de la pompe à protons et réduit ainsi l'acidité de l'estomac) ainsi qu'une supplémentation en vitamines liposolubles (A, D, E, K). Pour une atteinte endocrine, en cas d'intolérance au glucose le patient devra ingérer des glucides de faible index glycémique et s'il est atteint de diabète, une insulinothérapie devra être initiée.

Pour l'atteinte hépatobiliaire, de l'acide ursodesoxycholique (~ 1-2 % des acides biliaires totaux) est administré à de fortes doses (20-25 mg/kg/jour) en cas de cholestase conférant des effets protecteurs et cholérétiques (favorise la production de bile par le foie). Des vaccins contre l'hépatite A et B sont conseillés aux patients.

Dans le cas d'une atteinte osseuse, les patients sont supplémentés en vitamine D et en biphosphonates et pratiquent une activité physique (Spielberg and Clancy, 2016).

2) Prise en charge de l'atteinte pulmonaire

Il existe deux grands groupes de traitement pour les patients atteints de mucoviscidose : les traitements curatifs et les symptomatiques (figure 25). Ceux visant à améliorer l'atteinte pulmonaire sont les plus nombreux et variés, et se classent en trois groupes : traitements de la clairance mucociliaire, les anti-infectieux et les anti-inflammatoires (Spielberg and Clancy, 2016).

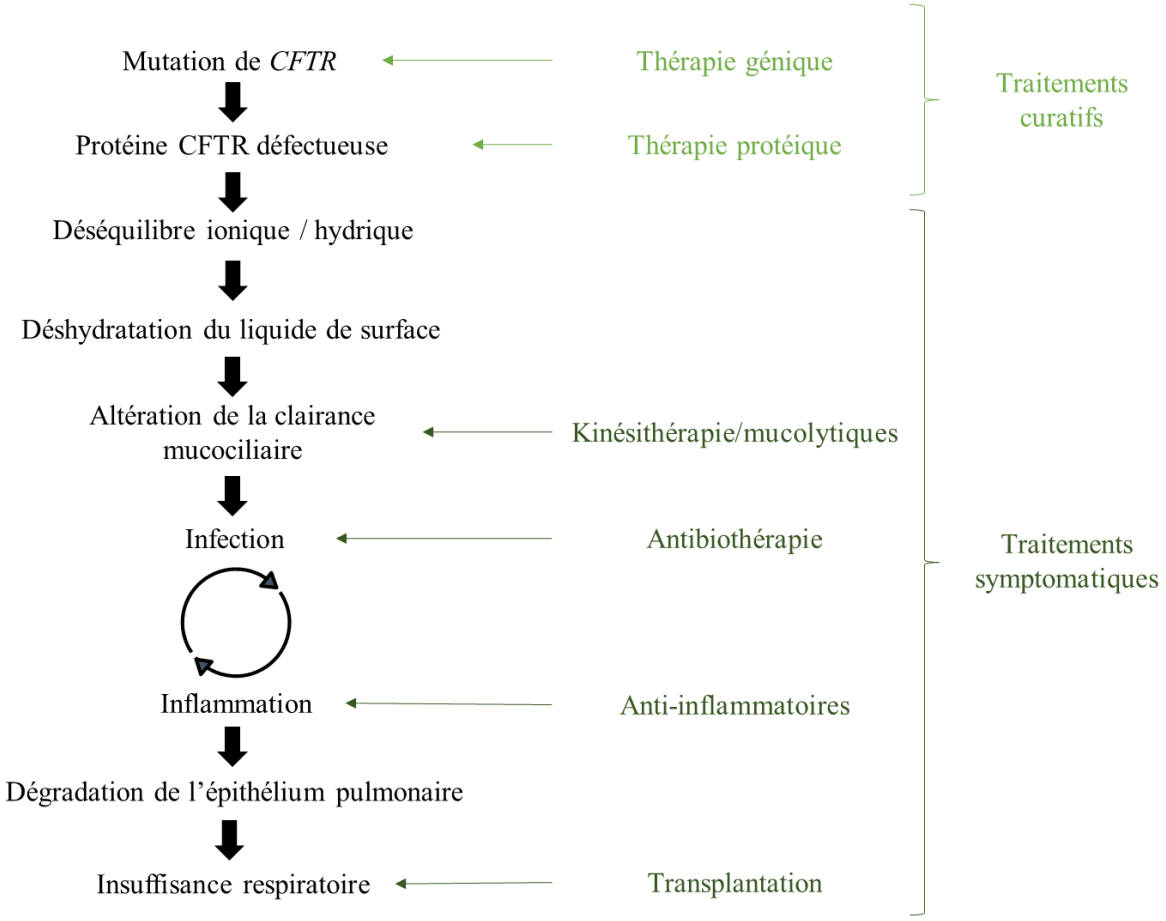


Figure 25 : Stratégies thérapeutiques pour la prise en charge de l'atteinte respiratoire des patients atteints de mucoviscidose.

a. Thérapie améliorant la clairance mucociliaire

L'amélioration de la clairance mucociliaire implique l'utilisation de traitements mécaniques : kinésithérapie respiratoire quotidienne ou utilisation d'une veste de compression pulmonaire permettent l'évacuation du mucus et la diminution de sa viscosité ainsi que des traitements pharmacologiques.

Ces derniers par voie inhalée contribuent à améliorer la clairance mucociliaire : l'utilisation de DNase recombinante humaine (rhDNase ou dornase α ou Pulmozyme®) par nébulisation (Fuchs et al., 1994; Gutteridge and Kuhn, 1994) ou du sérum salé hypertonique. La rhDNase est un mucolytique, dégradant l'ADN présent en excès provenant de la dégradation de cellules présentes sur le site de l'inflammation comme les PNN. Ainsi elle contribue à améliorer la fonction pulmonaire en diminuant le nombre d'exacerbation des patients atteints de mucoviscidose (Mogayzel et al., 2013). Le sérum salé hypertonique, quant à lui, va augmenter l'hydratation des VA et donc augmenter la clairance mucociliaire. En phase de développement clinique, plusieurs bloqueurs de la fonction du canal ENaC (BI1265162, SPX-101, AZD5634, IONIS-ENaC2.5Rx) sont en tests (figure 26).

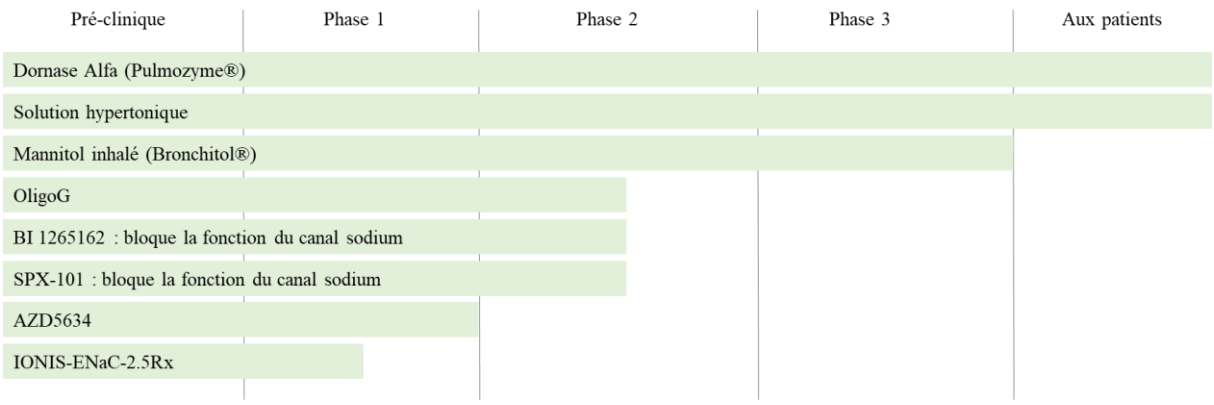


Figure 26 : Traitements améliorant la clairance mucociliaire (https://www.cff.org/Trials/Pipeline).

b. Thérapie anti-infectieuse

Lors d'infection, un ECBC ainsi qu'un antibiogramme permettent d'identifier la bactérie puis d'évaluer sa sensibilité aux antibiotiques et de proposer une antibiothérapie adéquate. La prévalence de l'infection par *P. aeruginosa* augmente avec l'âge (figure 21). Cette bactérie représente le pathogène le plus retrouvé au niveau des poumons. En effet, la colonisation par *P. aeruginosa* est associée à un déclin plus rapide de la fonction pulmonaire des patients (Emerson et al., 2002).

Le développement de stratégies d'éradication des bactéries a émergé avec l'objectif de retarder le développement de l'infection chronique. Dans cette optique la tobramycine inhalée est recommandée pour traiter ce type d'infection.

Une version concentrée pour nébulisation (Bekthis T100 et Vantobra) et une version en poudre sèche (TOBI) ont été développées mais ce n'est pas la seule molécule présente sur le marché (figure 27). La colistine, présentant des effets similaires à la tobramycine a été approuvée en Europe (Schuster et al., 2013).

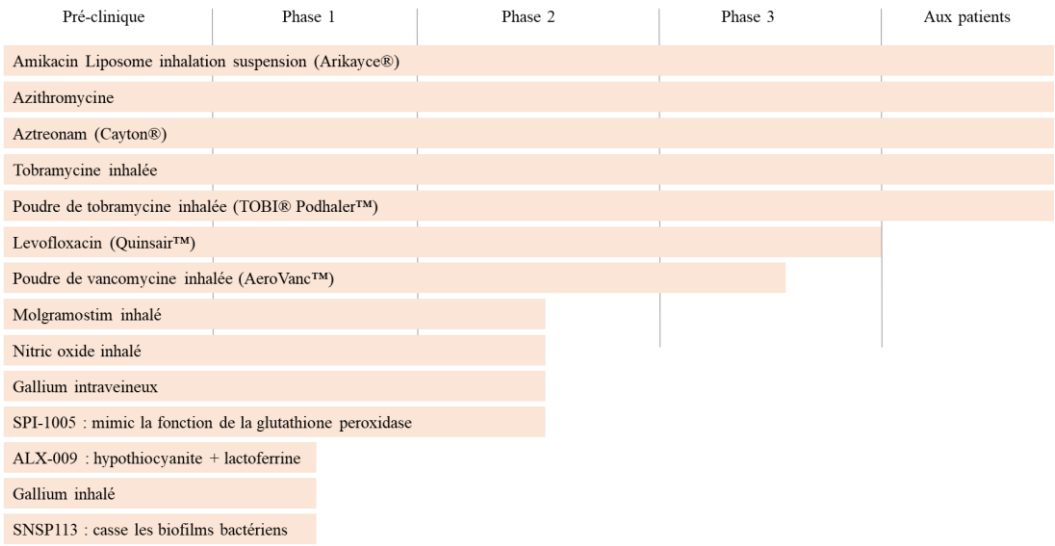


Figure 27 : Traitements anti-infectieux (https://www.cff.org/Trials/Pipeline).

c. Thérapie anti-inflammatoire

Dans les VA des patients atteints de mucoviscidose, l'inflammation est précoce et est accentuée par les infections à répétition avec une infiltration massive de PNN. Les traitements anti-inflammatoires comme la corticothérapie par voie inhalée (bénéfice non prouvé) ou générale permettent de diminuer le recrutement de ces PNN et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Les traitements anti-inflammatoires en cours de développement ou donnés aux patients sont répertoriés sur la figure 28 suivante.

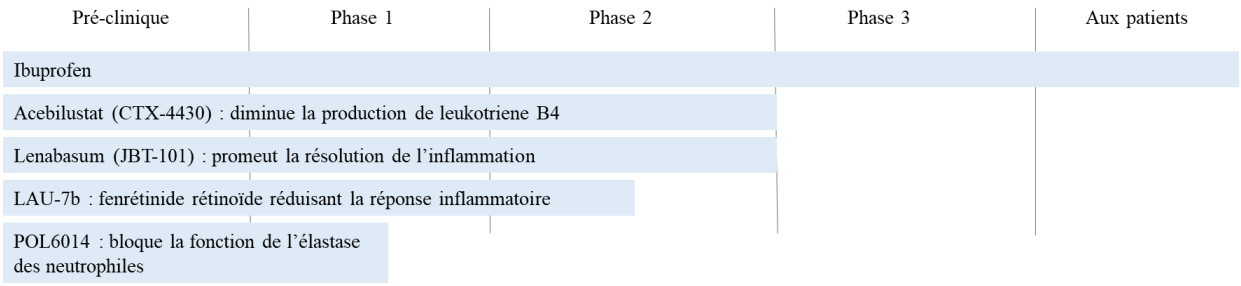


Figure 28 : Traitements anti-inflammatoires (https://www.cff.org/Trials/Pipeline).

Cependant des antibiotiques possèdent aussi des propriétés anti-inflammatoires comme par exemple, l'azythromycine, un composé de la famille des macrolides. L'azythromycine présente une action anti-inflammatoire induisant une amélioration de la fonction respiratoire des patients après six mois de traitement (Southern et al., 2012). Une étude multicentrique reste cependant nécessaire pour déterminer l'impact de son utilisation à plus long terme. Une liste exhaustive des traitements anti-inflammatoires actuellement disponibles pour les patients CF est représentée ci-dessous (tableau 4).

	MOLECULES	REFERENCES
ANTI-INFLAMMATOIRES A SPECTRE LARGE	Corticostéroïdes Ibuprofène*	Eigen *et al.* 1995 Konstan *et al.* 1995
MUCOLYTIQUES	Dornase alpha*	Konstan et Ratjen 2012
ANTIBIOTIQUES AUX PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES	Tobramycine Azythromycine* Anticorps anti-PcrV	Noah *et al.* 2010 Ratjen *et al.* 2012 Milla *et al.* 2014
MODULATEURS DE LA SIGNALISATION INTRACELLULAIRE	IL-10 Interféron-γ	Mueller *et al.* 2009 Moss *et al.* 2005
ANTI-OXYDANTS	N-acétyl cystéine	Tam *et al.* 2013
INHIBITEURS DE LA MIGRATION DE NEUTROPHILE	Anti-IL-8 Anti-IL-17 Ibuprofène*	Mackerness *et al.* 2008 Hsu *et al.* 2016 Konstan *et al.* 2003
ANTI-PROTEASES	Alpha AntiTrypsine recombinante	Griese *et al.* 2007
	Inhibiteur d'élastase des neutrophiles	Cooley *et al.* 2011

Tableau 4 : Traitements anti-inflammatoires évalués ou utilisés chez les patients atteints de mucoviscidose (Cantin et al., 2015) (*) Médicaments recommandés par la CFF (*Cystic Fibrosis Foundation*).

d. Transplantation pulmonaire

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

3) Nouvelles stratégies thérapeutiques

a. Thérapie génique

La thérapie génique pour la mucoviscidose se poursuit depuis la découverte du gène *CFTR* en 1989 à travers quatre corrections possibles : les vecteurs viraux et non-viraux, les ARNm de substitutions, les endonucléases et les oligonucléotides ARN (figure 29).

Les vecteurs transportant des acides nucléiques à l'intérieur de la cellule se divisent en deux catégories : les vecteurs viraux et les vecteurs non-viraux. En général, les vecteurs viraux sont plus efficaces et adaptés car ils peuvent infecter la cellule en outrepassant les barrières physiques telles que le mucus et le liquide périciliaire qui nous protègent des virus, bactéries et autres particules inhalées.

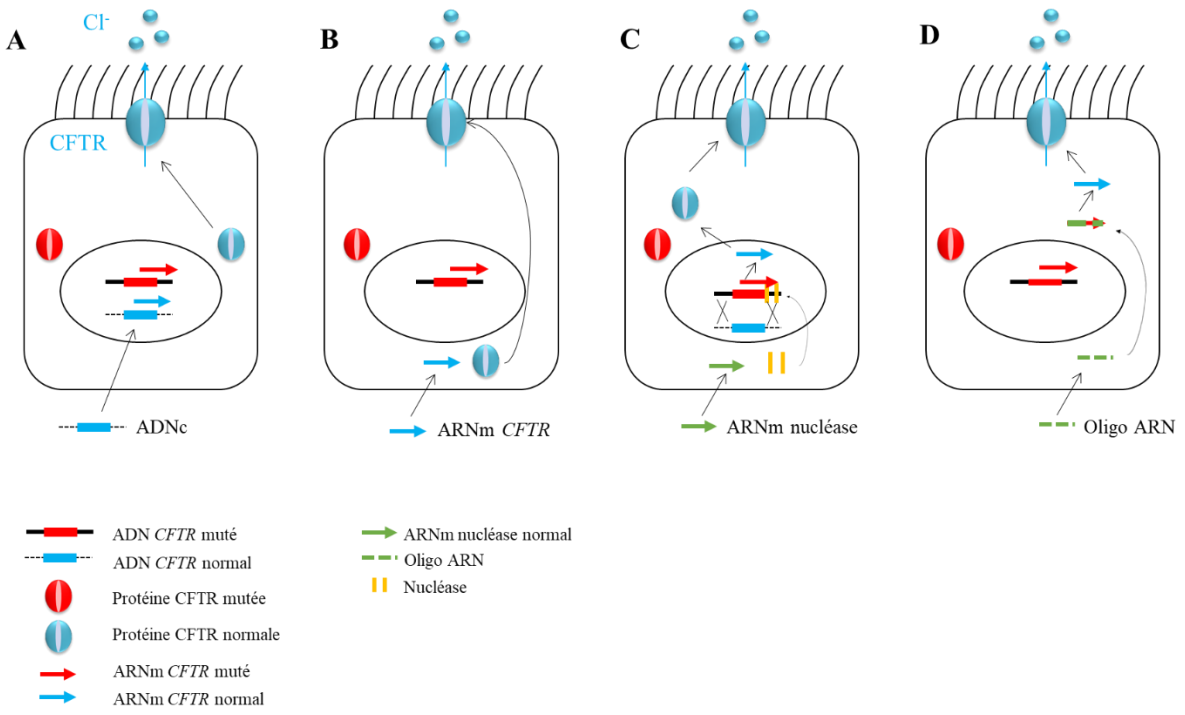


Figure 29 : Représentation schématique des stratégies thérapeutiques qui sont développées pour la mucoviscidose. Les bases de concept de la thérapie génique (A), thérapie ARNm (B), l'édition de gène (C) et la réparation d'ARNm (D). En plus des ions Cl^-, le canal CFTR conduit d'autres anions, incluant le bicarbonate, mais pour une question de simplification, ils ne sont pas représentés sur les schémas (Alton et al., 2016).

Les vecteurs viraux sont des adénovirus et des *Adeno Associated Virus* (AAV) transportant des protéines appropriées qui ont un tropisme naturel pour les poumons. Cependant des réponses immunitaires préexistantes ou induites peuvent affecter l'efficacité et la durée de l'expression du vecteur, limitant ainsi le traitement sur le long-terme pour la mucoviscidose.
Actuellement il n'y a pas de preuve préclinique ou d'essai clinique démontrant que l'administration répétée (trois fois ou plus) d'adénovirus ou d'AAV est faisable sans perte d'efficacité (Alton et al., 2016).

Les vecteurs non-viraux, ne contenant pas de protéine, tels que les nanoparticules d'ADN avec un CFTR non muté, induisent moins de réponses immunitaires. Les plasmides de premières générations tel que pGM169 ont été améliorés en éliminant les îlots CpG, en optimisant le codon de l'ADNc de *CFTR* et en incorporant le nouvel élément régulateur, hCEFI, constitué d'un promoteur du facteur d'élongation 1α couplé à l'amplificateur de CMV (CytoMégaloVirus) humain (Hyde et al., 2008). Dans une étude clinique de phase 1/2a, le pGM169/GL67A montre des effets significatifs sur la fonction pulmonaire mais avec des changements minimes dans le transport des ions. Cette discordance peut provenir du temps ou de la sensibilité du traitement, du site où les mesures ont été effectuées et/ou de la zone relativement petite des voies respiratoires évaluées lors de l'utilisation des analyses moléculaires.

Le traitement par des nanoparticules d'ADN contenant de l'ADNc de *CFTR* a été testé en essai clinique de phase 2b, pour 140 patients inclus avec un gène *CFTR* normal conditionné avec les vecteurs lipidiques ou le placebo et administré par inhalation une fois par mois pendant 1 an et a montré une amélioration modeste du déclin de la fonction respiratoire (Alton et al., 2015).

Les vecteurs lentivirus n'ont pas de tropisme naturel pour les poumons, et nécessitent donc des pseudotypes avec une enveloppe protéique appropriée pour faciliter le transfert du gène dans les poumons. Il est nécessaire aussi de pré-conditionner le tissu avec des détergents qui vont endommager l'épithélium et permettre l'accès à la membrane basolatérale *via* les espaces intracellulaires. Il a été montré qu'une dose unique de lentivirus entraîne une stabilité de l'expression génique de ~ 2 ans dans les poumons murins et qu'une administration répétée (10 doses/jour, ou 3 doses à des intervalles d'un mois) est possible, sans entraîner de mutagénèse insertionnelle ou de toxicité (Griesenbach et al., 2012; Mitomo et al., 2010; Sinn et al., 2008).

Pendant plusieurs années, les chercheurs étaient incapables d'utiliser des IVT (*In Vitro Transcribed*) ARNm pour augmenter l'expression protéique *in vivo*, car ceux-ci étaient directement reconnus et détruits par le système immunitaire (Kariko et al., 2008). L'incorporation de substitution de nucléosides variés a permis d'augmenter la stabilité des IVT et de diminuer l'immunogénicité (Kariko et al., 2011). Bien que les transcrits de *CFTR* soient longs et compliquent la thérapie à ARNm, des modifications chimiques, un assemblage à des nanoparticules et différentes voies d'administration sont en cours d'investigation comme montrés dans d'autres études (Mahiny et al., 2015; Mays et al., 2013).

Le développement d'endonucléases à ADN pouvant créer des DSB (*Double-Stranded Break*) dans un gène cible, tel que *CFTR*, permettrait de prévenir les cassures *off-target*. Dans ce sens plusieurs approches thérapeutiques sont en cours de développement parmi lesquelles le ZFN (Z*inc Finger Nucleases*) (Lee et al., 2012), TALENs (*TAL-Effector Nucleases*) (Suzuki et al., 2016), une nucléase spécifique de l'ADN guidée par de l'ARN : CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/associated protein 9*) (Kleinstiver et al., 2016; Schwank et al., 2013; Slaymaker et al., 2016) et une nucléase guide ARN : Cpf1 (Zetsche et al., 2015). Ces endonucléases ne sont pas délivrées au niveau des poumons par un vecteur non-viral mais par des vecteurs viraux ou directement comme protéines avec des vecteurs lentivirus modifiés (Cai et al., 2014; Choi et al., 2016; Holkers et al., 2013; Lombardo et al., 2007).

La réparation de l'ARNm peut être effectuée par des oligonucléotides, de courtes séquences d'ARN simple ou double brin, généralement longues de 15-40 bases, qui sont modifiées pour plus de stabilité et augmenter l'absorption dans la cellule. Ce type de thérapie ne nécessite pas de vecteurs ou d'enveloppe pour leur utilisation et n'altère pas les cellules.

Il existe actuellement deux thérapies par oligonucléotides ARN dans la mucoviscidose, en phase de développement : la mutation d'épissage 3849+10 kb C-T de *CFTR* et QR-010 développé par *ProQR Therapeutics* qui cible spécifiquement la mutation F508del. Après des améliorations dans les courants Cl^-, une restauration du potentiel de différence nasale et une augmentation de la sécrétion de salive chez la souris, le traitement QR-010 est en cours d'étude clinique de phase Ib, NCT02532764.

b. Thérapie protéique

La thérapie protéique, approche pharmacologique faisant intervenir des correcteurs et des potentiateurs de CFTR, diffère selon les classes de mutations de *CFTR* (tableau 5).

Les mutations de classe 1 caractérisées par la présence d'un codon stop prématuré aboutissent à la production d'une protéine tronquée, non fonctionnelle. Des molécules ont été développées permettant de passer outre le codon stop et ainsi terminer la traduction de l'ARNm de *CFTR*. Ce phénomène de translecture a d'abord été mis en évidence dans une étude réalisée avec de la gentamycine, un antibiotique de la famille des aminoglycosides. Dans des essais thérapeutiques, la gentamycine a montré des effets bénéfiques sur les patients mais son administration prolongée a entraîné des effets secondaires néfastes sur les reins et dans l'oreille interne (Prayle et al., 2010; Wilschanski et al., 2003). Une molécule, l'Ataluren (PTC124) a par la suite été développée par *PTC Therapeutics*®. Après avoir montré des améliorations du transport du Cl^- au niveau de l'épithélium nasal des patients en phase d'essais cliniques 2, l'étude de cette gentamycine non-aminoglycoside est passée en phase 3 : NCT00803205 pour 238 patients porteurs d'une mutation de classe 1 de plus de 6 ans. Cependant, les résultats de cette étude n'ont pas montré de différence significative du VEMS ou du nombre d'exacerbation pulmonaire entre les groupes traités avec PTC124 *vs* placebo sauf pour un sous-groupe de patients n'utilisant pas d'aminosides inhalés (Kerem et al., 2014). Aussi une nouvelle étude clinique de phase 3 excluant spécifiquement les patients utilisant les aminosides inhalés avait été initiée mais depuis PTC a abandonné le développement de cette molécule pour le traitement de la mucoviscidose (Habib et al., 2019) (https://www.genengnews.com/news/ptc-halts-translarna-development-in-cystic-fibrosis-after-phase-iii-failure/). D'autres agents de translecture ont montré des résultats intéressants dans des études pré-cliniques comme les aminoglycosides synthétiques (Rowe et al., 2011; Xue et al., 2014) et les dérivés d'Ataluren (Pibiri et al., 2015; Pibiri et al., 2016).

MUTATIONS DES PATIENTS	ESSAIS CLINIQUES	PHASE	AGE	TRAITEMENT	SUIVI	REFERENCES
Non-sens	NCT00237380	2	≥ 18	Ataluren	56 j	Kerem et al. 2008
	NCT00351078	2	≥ 18	Ataluren	112 j	Wilschanki et al. 2011
	NCT00458341	2	6-18	Ataluren	28 j	Sermet-Gaudelus et al. 2010
	NCT00803205	3	≥ 6	Ataluren	48 sem	Kerem et al. 2014
G551D-hmz et htz	NCT00457821	2	≥ 18	Ivacaftor	28 j	Accurso et al. 2010, 2014
	NCT01117012	3	≥ 6	Ivacaftor	96 sem	McKone et al. 2014
	NCT00909532	3	≥ 12	Ivacaftor	48 sem	Ramsey et al. 2011 ; Quittner et al. 2015
	NCT01262352	2	≥ 6	Ivacaftor	48 sem	Davies et al. 2013a et b
	NCT01521338	4	≥ 6	Ivacaftor	6 mois	Rowe et al. 2014 ; O'Connor and Seegmiler 2016
	NCT01705045	3	2-5	Ivacaftor	24 sem	Davies et al. 2016
G551D sur au moins un allèle	NCT01614470	3	≥ 6	Ivacaftor	24 sem	De Boeck et al. 2014
Non-G551D *gating* ou résiduelles	NCT01707290	3	≥ 6	Ivacaftor	24 sem	***
R117H-hmz et htz	NCT01614457	3	≥ 6	Ivacaftor	24 sem	Moss et al. 2015
R117H et/ou mutations CFTR avec une fonction résiduelle sur au moins un allèle, G551D et/ou mutations *gating* sur au moins un allèle	NCT01685801	2	≥ 12	Ivacaftor	24 sem	***
F508del-hmz	NCT00865904	2	≥ 18	Lumacaftor	28 j	Clancy et al. 2012
	NCT00953706	2	≥ 12	Ivacaftor	16 sem	Flume et al. 2012
	NCT01807923	3	≥ 12	Lumacaftor et Ivacaftor (L & I)	24 sem	Wainwright et al. 2015 ; Elborn et al. 2016
	NCT01807949	3	≥ 12	L & I	24 sem	Wainwright et al. 2015 ; Elborn et al. 2016
	NCT01897233	3	6-11	L & I	24 sem	***
	NCT01931839	3	≥ 12	L & I	96 sem	***
F508del-hmz et htz	NCT01225211	2	≥ 18	L & I	56 j	Boyle et al. 2014
	NCT01531673	2	≥ 12	Vx-661 et/ou Ivacator	28 j	***

Tableau 5 : Etudes cliniques sur les modulateurs de CFTR chez les patients atteints de mucoviscidose (hmz : homozygote, htz : hétérozygote, * manuscrit non disponible) (Lopes-Pacheco, 2016).**

Les mutations de classe 2 sont caractérisées par un défaut de maturation cellulaire de la protéine CFTR au niveau du RE, elle sera donc redirigée et dégradée par le protéasome. *Vertex Pharmaceuticals* a développé des correcteurs, permettant d'empêcher la dégradation de la protéine mutée et donc son réadressage à la membrane plasmique, tels que le Vx-809 (Lumacaftor). Des études *in vitro* ont montré que cette molécule pouvait augmenter la maturation et l'expression de CFTR à la membrane, les courants Cl^- dépendants de CFTR et l'épaisseur du liquide de surface des VA (Van Goor et al., 2011). Cependant aucune diminution significative des niveaux de Cl^- dans la sueur ou d'augmentation du VEMS n'a été observée chez les patients F508del homozygotes lors d'une étude clinique de phase 2 (Clancy et al., 2012).

Les mutations de classe 3 caractérisées par une protéine correctement synthétisée et localisée à la membrane plasmique, mais dont les domaines NBD sont affectés, présentent une probabilité d'ouverture du canal plus faible altérant les efflux Cl^-. Le Kalydéco® (Ivacaftor ou Vx-770), développé par *Vertex Pharmaceuticals* est le premier potentiateur de la conductance en Cl^- *via* un mécanisme ATP-indépendant non conventionnel (Eckford et al., 2012) a avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché par la commission européenne (Van Goor et al., 2009).

Initialement destiné aux enfants de plus de 6 ans porteurs d'une mutation G551D (présente chez 1,6 % des patients français), son autorisation a été étendue à 8 autres mutations supplémentaires : G1224E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N et S549R, en raison des améliorations retrouvées chez ces patients (De Boeck et al., 2014). En effet, dès deux semaines de traitement et pendant les 48 semaines des deux essais cliniques de phase 3 réalisés, la fonction pulmonaire est améliorée, le nombre d'exacerbation est diminué (10 %), les symptômes respiratoires, le poids et la concentration en Cl^- dans la sueur sont aussi améliorés (Barry et al., 2014; Davies et al., 2013; Ramsey et al., 2011). Ce traitement représente ~ 3 000 patients dans le monde pour 200 000 €/patient/an. Suite à ces résultats bénéfiques chez les patients, *Vertex Pharmaceuticals* a souhaité étudier l'effet du Kalydéco® sur des patients homozygotes F508del. Cependant, la molécule n'a montré aucun effet positif suggérant que l'utilisation d'un potentiateur n'était pas suffisante pour ces patients (Flume et al., 2012).

L'association Vx-809 / Vx-770 (Orkambi®) a montré, dans deux études cliniques de phase 3 incluant 1 108 patients de plus de 12 ans homozygotes F508del, une augmentation modeste du VEMS de ~ 5 %, une diminution du nombre d'exacerbations respiratoires et d'hospitalisation des patients (Boyle et al., 2014; Elborn et al., 2016; Wainwright et al., 2015). Ces résultats positifs ont permis à l'Orkambi® d'obtenir une autorisation de mise sur le marché par la FDA (*Food and Drug Administration* ; 2015) et l'EMA (*European Medicines Agency ;* 2016). Cela pourrait représenter ~ 20 000 patients dans le monde pour 230 000 €/patient/an, même si le prix n'est pas totalement déterminé pour le moment.

Le Vx-661 (Tezacaftor), un autre correcteur de CFTR est également en cours d'essai clinique de phase 3 pour les patients homozygotes F508del et hétérozygotes, en combinaison ou non avec Vx-770. En mai 2019, la société *Vertex Pharmaceuticals* a annoncé qu'elle demanderait l'agréement par la FDA de sa nouvelle combinaison : Vx-445 (Elexacaftor, un modulateur de CFTR) + Vx-661/Vx-770 sous le nom de Symdeko® au troisième trimestre de 2019 (https://www.cff.org/News/News-Archive/2019/Vertex-Selects-Triple-Combination-With-VX-445-to-Submit-for-FDA-Approval/?utm_source=newsletter&utm_medium=email&utm_content=Vertex%20FDA%20Approval&utm_campaign=June19DigestSV). Si celle-ci est approuvée, la triple association concernerait plus de 90 % des patients CF.

Les mutations de classe 4 se caractérisent par une protéine CFTR correctement formée et localisée à la membrane plasmique mais dont le flux d'ions et la sélectivité du canal sont altérés. Des traitements visant à stabiliser la protéine à la membrane et ainsi diminuer le taux de dégradation sont en cours de développement tels que la combinaison HGF (*Hepatocyte Growth Factor*)/Vx-809 (Loureiro et al., 2015), VIP (*Vasoactive Intestinal Peptide*) (Alshafie et al., 2014; Rafferty et al., 2009) et Cavosonstat/Vx-809/Vx-770 (Marozkina et al., 2010; Zaman et al., 2016).

Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif pour les patients atteints de mucoviscidose. Il est donc nécessaire de proposer de nouvelles pistes d'investigation pour élaborer de nouvelles thérapies.

c. Thérapie anti-inflammatoire

Des stratégies thérapeutiques anti-inflammatoires pour la mucoviscidose, telles que le brevenal et la curcumine, sont étudiées actuellement.

Le brevenal, un inhibiteur de la liaison des brevetoxines aux canaux sodiques, est issu d'une algue marine *Karenia brevis* (Bourdelais et al., 2004) et contribue à réduire la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires des macrophages et des cellules épithéliales pulmonaires humaines sans altérer l'expression de TLR4 à la surface des cellules et en maintenant la capacité de la cellule à répondre aux infections bactériennes (Keeler et al., 2019). Cependant, ce composé n'intervient pas dans l'activation des macrophages et diminue donc l'activation des cellules immunitaires.

En 2004, une équipe a montré que le traitement à la curcumine permettait de corriger les défauts associés à l'expression F508del homozygotes de CFTR (Egan et al., 2004). Cette étude a fait controverse dans le domaine scientifique et son caractère de correcteur de CFTR n'est plus envisagé. Cependant, il a été montré qu'en tant qu'agent anti-inflammatoire dérivé de l'épice curcuma, la curcumine inhibe l'expression et la fonction de TLR2 à travers la dégradation de SP1 (*Specificity Protein 1*) dans des cellules épithéliales bronchiques CF *via* des processus oxydatif et de dégradation par le protéasome (Chaudhary et al., 2019).

Ces résultats préliminaires ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques anti-inflammatoires et devront être confirmés par la suite dans des modèles animaux pour validation.

II. Les microARN

1. Découverte des miARN

La régulation des ARN dans les cellules eucaryotes révèle progressivement ses secrets depuis 30 ans. Un des premiers constats de « RNA silencing » fut réalisé dans les plantes, et plus précisément dans les pétales de pétunia *(Petunia).* En tentant de surexprimer une enzyme de la pigmentation, par introduction dans les plantes d'un clone chimérique à base d'ADNc du gène codant l'enzyme, l'équipe de Jorgensen a observé qu'il n'y avait pas de pigmentation plus intense et qu'au contraire cela bloquait la synthèse du pigment. Les fleurs devenaient complètement blanches ou bien partiellement pigmentées. L'étude des transcrits dans les pétales blancs a révélé que malgré une transcription correcte du gène endogène de l'enzyme, la quantité d'ARNm était 50 fois moindre que dans les pétales sauvages, et associée à un faible niveau d'expression du gène chimérique. Ils avaient à cette époque évoqué une interaction coordonnée et réversible entre ces séquences homologues, sans toutefois élucider le mécanisme (Napoli et al., 1990). Quelques années plus tard, il a été rapporté que dans le nématode *Caenorhabditis elegans* un ARN double brin exogène peut, spécifiquement et de façon complémentaire, inhiber l'expression d'un transcrit selon le mécanisme de l'ARN interférence (ARNi) (Fire et al., 1998; Lee et al., 1993; Mello and Conte, 2004; Wightman et al., 1993).

2. Principe de l'ARN interférence

L'ARNi est un procédé biologique post-transcriptionnel permettant la régulation de l'expression des gènes par action sur les ARNm, se traduisant généralement par une inhibition de l'expression du gène (Carthew and Sontheimer, 2009). Cette voie de régulation des ARN est activée par les cellules eucaryotes dans plusieurs processus physiologiques (défense de l'hôte contre les infections virales, implication dans plusieurs cancers, etc) (Bartel, 2004; Macrae et al., 2006). Le principe de l'ARNi est basé sur la complémentarité de séquence entre un ARNm et une petite molécule ARN, dont les principaux représentants sont les *small interfering RNA* (siARN) et les microARN (miARN) (tableau 6).

PROPRIETES	miARN	siARN
ORIGINE	Plantes, insectes, vers, Mammifères	Plantes, insectes, vers
STRUCTURE	Simple brin	Double brin
LONGUEUR	18-25 nucléotides	
PRECURSEUR	ARN transcrit endogène	ARN double brin exogène
ARNm CIBLE	Plusieurs	Unique
COMPLEMENTARITE DE L'ARNm CIBLE	Partielle ou totale, peu cibler plusieurs ARNm	Parfaite, spécifique
CODAGE	Locus génomique distinct Encodé par leurs propres gènes	Encodé par des transposons, des virus, de l'hétérochromatine
BIOGENESE	Molécule d'ARN simple qui inclut une structure secondaire en forme de boucle imparfaite	Duplexe bimoléculaire d'ARN long ou tige-boucle élargie
ACTION PRIMAIRE	Inhibe la traduction des ARNm	Clivage de l'ARNm
PARTENAIRE D'ACTION	RISC	
LIEU DE FIXATION	Région 3'-UTR de l'ARNm	Région codante de l'ARNm
FONCTION	Régulateur endogène négatif de l'expression des gènes	Inhibiteur de l'expression des gènes : défense virale et stabilité génomique
CONSERVATION A TRAVERS L'EVOLUTION	Presque toujours	Rarement
AGENT THERAPEUTIQUE	Oui	
BIOMARQUEUR	Oui	Non

Tableau 6 : Comparaison des miARN et des siARN.

3. Biosynthèse des miARN

La biosynthèse des miARN se fait en plusieurs étapes, de la transcription du gène du miARN en transcrit primaire, puis son clivage, son export et sa maturation dans le cytoplasme en miARN mature.

1) Organisation génomique

Les miARN ont une origine endogène et sont codés par des gènes dont l'expression est régulée par les cellules. Ces gènes peuvent être soit dans des régions génomiques indépendantes et les miARN sont appelés « intergéniques », soit dans des régions de transcription codant pour des protéines et les miARN sont appelés « introniques » ou « exoniques » (Saini et al., 2008). Les gènes codant les miARN codent souvent des familles, ou « clusters », de miARN, ceux-ci sont appelés « polycistroniques » lorsqu'ils sont sous la dépendance du même promoteur (Kapinas and Delany, 2011; Ozsolak et al., 2008) (figure 30).

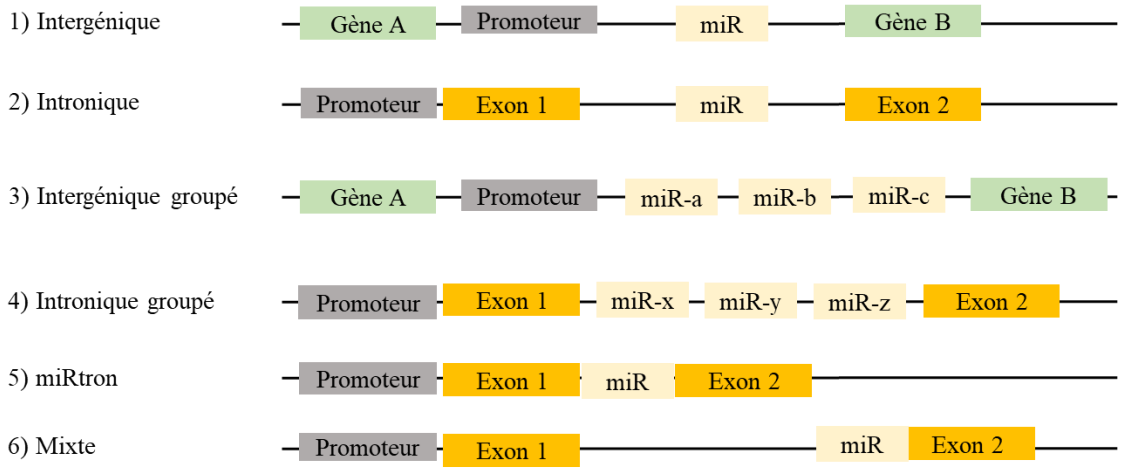


Figure 30 : Localisation des gènes de miARN dans le génome : (1) miARN pouvant être trouvé entre deux gènes (intergénique) ou (2) dans un gène (intronique). (3) Ils peuvent être présents dans un seul gène de miARN ou (4) dans un groupe de gènes de miARN. (5) Parfois les miARN introniques peuvent exister entre deux exons (miRtron) ou (6) chevaucher un exon et un intron de gènes non codés (mixte) (Bardin et al., 2018b).

2) Transcription du pri-miARN

La biogénèse des miARN se fait en plusieurs étapes. La première étape consiste en la transcription des gènes codant les miARN par l'ARN polymérase II en transcrit primaire formant le pri-miARN en forme de tige-boucle de plusieurs centaines/milliers de nucléotides (figure 31 ; 1) (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004).

Les pri-miARN ont une structure typique composée d'une tige de ~ 33 pb (paires de base) et une boucle terminale reliant les deux brins de la tige. Ces séquences possèdent une coiffe avec une structure 7-méthyl-guanosine (m7G) en 5' et une queue polyA en 3', comme pour les ARNm.

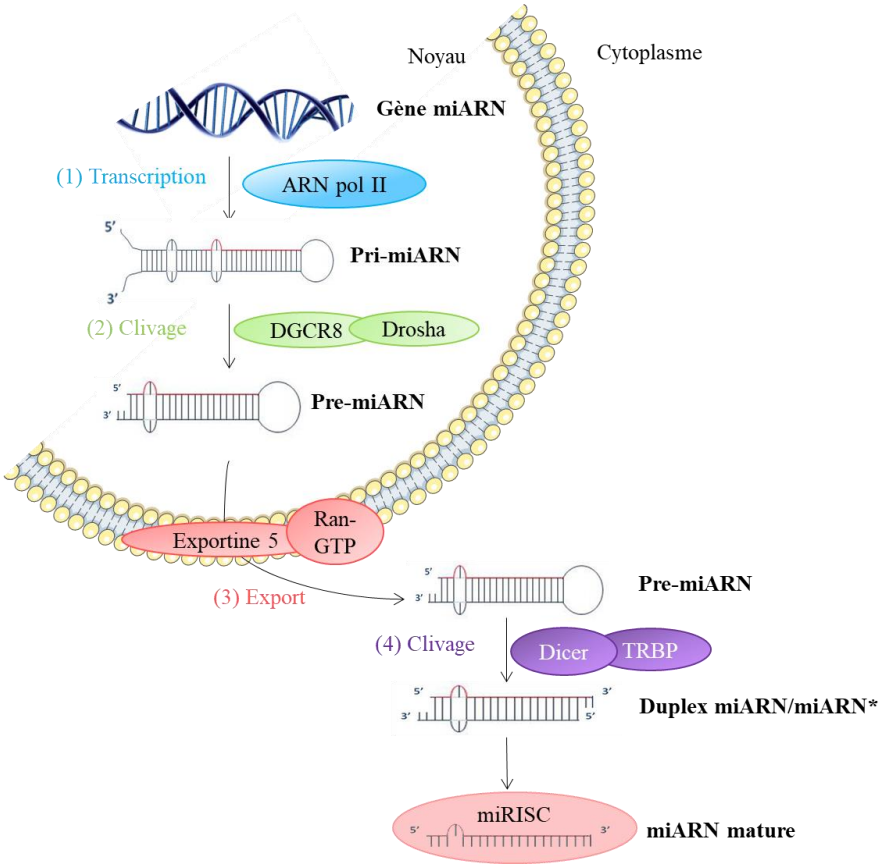


Figure 31 : Biosynthèse des miARN : (1) la biosynthèse commence dans le noyau par la transcription de gènes de miARN par la polymérase II (pol II). (2) Les longs transcrits, pri-miARN, sont clivés par Drosha et la protéine DGCR8 créant un pre-miARN avec une structure en tige-boucle. (3) L'exportine 5 transfère le pre-miARN dans le cytoplasme. (4) Le pre-miARN est clivé par Dicer en une forme mature de miARN simple brin replié. Ce miARN mature est incorporé dans un complexe miRISC ribonucléoprotéique. Ce complexe peut agir directement sur l'ARNm de la cellule où il a été synthétisé ou sortir de la cellule (Bardin et al., 2018b).

3) Maturation nucléaire du pri-miARN

La première maturation consiste au clivage du long transcrit pri-miARN dans le noyau par le complexe multiprotéique *microprocessor* : protéines Drosha (enzyme RNase III) et DGCR8 (*DiGeorge syndrome Critical Region gene 8* ; protéine de liaison à l'ARN double brin) libérant un précurseur, le pre-miARN d'environ 70 nucléotides (figure 31 ; 2) (Denli et al., 2004; Han et al., 2006; Landthaler et al., 2004; Lee et al., 2003b).

Les deux protéines ne peuvent pas agir séparément, seule leur association permet d'obtenir l'activité catalytique nécessaire à la maturation du pre-miARN (Gregory et al., 2004). La fixation de DGCR8 au niveau de la jonction simple brin – double brin permet à Drosha de réaliser le clivage. Celui-ci se fait asymétriquement sur les deux brins de la tige provoquant sa libération. Le pre-miARN obtenu forme une structure tige-boucle avec deux nucléotides non appariés en 3' et un groupement phosphate en 5' (Han et al., 2006).

Ce complexe possède la particularité de s'autoréguler, DGCR8 stabilise Drosha en terme d'interaction protéique et Drosha régule négativement l'expression de DGCR8 en clivant la structure tige-boucle en 5' de son ARNm entraînant sa dégradation (Han et al., 2009). Drosha peut exciser plusieurs pre-miARN d'un seul pri-miARN, ce qui coordonne l'expression d'une famille de miARN.

Le complexe *microprocessor* peut être régulé par des hélicases (p68 et p72) qui favoriseraient la sélection et la maturation de certains pri-miARN spécifiques (Fukuda et al., 2007) ou par des protéines SMAD, impliquées notamment dans la transduction du signal de la voie TGF-β, qui faciliteraient la maturation par Drosha (Davis et al., 2008) ou encore par un mécanisme de régulation négatif de la maturation comme les enzymes ADAR (*Adenosine Deaminase Acting on RNA*) qui inhiberaient le clivage par Drosha (Yang et al., 2006).

Il existe des miARN ne nécessitant pas de clivage par le *microprocessor* et qui sont générés directement par épissage. Cette voie de génération des pre-miARN est appelée miRtron et concerne les miARN présents dans de courts introns (figure 30). L'intron libéré après l'épissage se structure en tige-boucle et les extrémités générées correspondent aux sites d'épissage donneur (AG) en 5' et accepteurs (GU) en 3'.

4) Export dans le cytoplasme

Ce pre-miARN est exporté du noyau vers le cytoplasme par l'exportine 5 (appartient à la famille des karyophérines β) *via* un mécanisme Ran-GTP-dépendant (figure 31 ; 3) (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). L'exportine 5 se lie spécifiquement et directement au co-facteur Ran-GTP dans le noyau puis se fixe aux nucléoporines pour permettre l'export du pre-miARN. La formation de ce complexe contribue à protéger le pre-miARN de la dégradation par les nucléases et l'hydrolyse du Ran-GTP en Ran-GDP dans le cytoplasme permet la dissociation du complexe et donc la libération du pre-miARN dans le cytoplasme.

5) Maturation cytoplasmique du pre-miARN

Une fois dans le cytoplasme, le pre-miARN est clivé par le complexe Dicer-TRBP (*TAR-Binding Protein* ; une RNase III) libérant le miARN mature (figure 31 ; 4) (Zhang et al., 2004).

Dicer peut interagir avec des protéines de liaisons à l'ARN double brin, qui ne sont pas indispensables mais le stabilisent, telles que TRBP et/ou PACT (*Protein Activator of the interferon-induced protein kinase*) (Lee et al., 2006). Le clivage permet d'éliminer la boucle du pre-miARN et génère ainsi un duplex miARN/miARN* de ~ 20 pb avec des extrémités 3' sortantes de deux nucléotides de chaque côté (Zhang et al., 2004). Le brin miARN est appelé brin guide ou miARN mature et l'autre miARN*, qui donneront naissance au miARN mature 3p et/ou 5p.

Ce miARN mature va être incorporé au sein d'un complexe ribonucléoprotéique RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) formé de Dicer et d'une endonucléase de la famille des protéines Argonaute (Ago). Le complexe RISC est activé par dissociation du duplex. Alors que le miARN mature est lié à RISC et va se fixer sur l'ARNm cible et ainsi réprimer l'expression traductionnelle de sa cible, le miARN* est généralement dégradé (Meister et al., 2004). La sélection du brin mature au sein de ce duplex dépend de la stabilité thermodynamique des extrémités : le brin le plus faiblement apparié à son extrémité 5' est majoritairement incorporé au complexe RISC (Khvorova et al., 2003).

Le miARN peut ensuite directement agir dans la cellule où il est synthétisé ou sortir de la cellule (exosome, vésicule externalisée ou sécrétée) (Baulande et al., 2014).

6) Appariement à l'ARNm cible

De la même façon que les siARN, les miARN matures sont constitués d'un brin guide portant l'activité anti-sens, et d'un brin passager qui sera dégradé lors de l'association du miARN au complexe RISC (miARN*).

Toutefois, à l'inverse des siARN, les miARN matures possèdent une zone de complémentarité avec la cible réduite à 6 nucléotides. Il s'agit de la séquence *seed* située à l'extrémité 5' entre le 2ème et le 7ème nucléotide (Bartel, 2009; Lewis et al., 2005). Les éléments de reconnaissance des miARN, les MRE (*microRNA Response Element*) sont généralement localisés dans la région 3' non traduite (3'-UTR) des ARNm mais peuvent également être retrouvés au niveau de la séquence traduite, dans les séquences codantes ORF (*Open Reading Frame*) ou dans le 5'-UTR. A noter que les séquences *seed* des miARN et les MRE sont bien conservés intra- et inter-espèces au cours de l'évolution (Pritchard et al., 2012). L'action des miARN sur le transcrit ARNm se déroule en 2 temps :

- Dans un premier temps, la fixation du complexe miARN/RISC sur le MRE de l'ARNm cible induit l'inhibition de la traduction, probablement par dissociation du ribosome de l'ARNm (Wilczynska and Bushell, 2015) (figure 32).

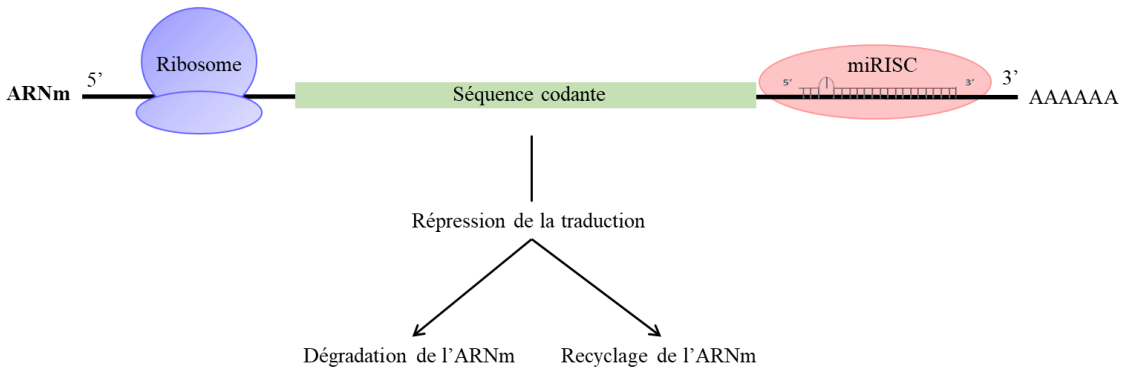


Figure 32 : Mécanisme d'action des miARN : le complexe miRISC altère la traduction de l'ARNm et entraîne une déstabilisation de l'ARNm par déadénylation et/ou inhibition de la traduction (Bardin et al., 2018b).

- Dans un second temps, plus la complémentarité entre la séquence *seed* et le MRE est parfaite (*perfect match*), plus l'induction du clivage par Ago2 (contenant un domaine RNase H, clivant un duplex ARN/ARN) et la dégradation de l'ARNm cible par les exonucléases sera rapide (Eichhorn et al., 2014). Au contraire, si la complémentarité est imparfaite (*imperfect match* ou *bulge*), non seulement la dégradation de la cible sera retardée et l'ARNm accumulé dans la cellule mais en outre le miARN restera hybridé plus longtemps avec la cible. Le degré de complémentarité entre le miARN et l'ARNm est donc considéré comme l'élément déterminant le mécanisme de régulation mais également la disponibilité des miARN dans la cellule (Ameres and Zamore, 2013; Carthew and Sontheimer, 2009; Friedman et al., 2009; Grimson et al., 2007; Hutvagner and Zamore, 2002a; Hutvagner and Zamore, 2002b; Ling et al., 2013; Rodriguez et al., 2004; Tomari and Zamore, 2005). Le blocage de la traduction sera suivi d'une dégradation de l'ARNm au sein des corps P (*P-bodies*), contenant notamment le complexe enzymatique DCP1/ DCP2 (*DeCaPping complex 1 / 2*) responsable de la dégradation de la coiffe.

D'autres facteurs interviennent dans la reconnaissance de l'ARNm cible par le miARN comme la structure secondaire de l'ARNm et notamment l'accessibilité de la séquence MRE qui influencent la fonctionnalité du miARN sur sa cible (Kertesz et al., 2007).

In fine, l'action des miARN conduit à la diminution de l'expression de la protéine résultante (Bartel, 2004). Le mécanisme d'ARNi permet donc de moduler finement l'expression des gènes et consiste ainsi en un rétrocontrôle négatif post-transcriptionnel du niveau d'expression des gènes (Baek et al., 2008; Kim et al., 2009; Selbach et al., 2008).

Cependant les miARN peuvent aussi avoir un rôle d'activateur de la traduction en modifiant l'interaction entre les éléments riches en AU (ARE) et les protéines liant ces ARE dans la région 3'-UTR (Bhattacharyya et al., 2006; Vasudevan and Steitz, 2007).

Par exemple, en se fixant au 3'-UTR du TNF-α, le miR-369 peut activer la traduction de l'ARNm du TNF-α, uniquement dans le cas où les cellules sont déprivées en sérum. Le miR-369 joue alors deux rôles : répresseur dans les cellules en prolifération et activateur lors de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G_0/G_1 (Vasudevan and Steitz, 2007). L'activation de la traduction de l'ARNm *via* la fixation en 5'-UTR ou à travers l'activation du promoteur ont aussi été démontrés. Le miR-122 en se fixant à la région 5'-UTR de l'ARNm du virus de l'hépatite C (HCV) permet de stimuler sa réplication (Henke et al., 2008). Le miR-373 en ciblant les séquences de promoteurs permet d'induire l'expression de gènes (Place et al., 2008).

4. Mode d'action des miARN

1) Interaction avec les transcrits

La biologie des miARN, du fait de leur petite taille, leur permet d'avoir plusieurs ARNm cibles. En effet, puisque l'activité est dépendante de la séquence *seed* longue de seulement 6 nucléotides, un motif MRE peut être retrouvé sur différents ARNm. De même, un ARNm peut contenir le même MRE à plusieurs reprises mais également plusieurs autres MRE. Toute la complexité de cette interaction se retrouve donc dans le fait qu'un miARN peut réguler plusieurs ARNm, et un ARNm peut être régulé par plusieurs miARN. Cette particularité positionne donc les miARN en tant que passe-partout, ayant un rôle prépondérant au sein de réseaux complexes de régulation de l'expression de multiples gènes (Bajan and Hutvagner, 2014; Li and Zhang, 2013).

Les ARNm sont positionnés comme des éléments passifs de la répression post-transcriptionnelle qu'ils subissent, alors que les miARN en sont les protagonistes actifs. De ce point de vue conventionnel, l'action unilatérale du miARN sur les ARNm a été remise en question au profit d'interactions bilatérales entre les transcrits et les miARN.

Pandolfi et son équipe ont décrit les *competing endogenous RNA* (ceRNA) comme des réseaux au sein desquels les éléments tels que les ARN messagers, pseudogènes et ARN longs non codants (ARNlnc) entrent en compétition les uns avec les autres pour la régulation par un ou plusieurs miARN, selon les règles de complémentarité entre les miARN et les MRE présentés précédemment (Poliseno et al., 2010; Salmena et al., 2011). Plusieurs ceRNA ont par la suite été décrits comme étant impliqués dans certains cancers, comme PTEN (*Phosphatase and TEnsin Homology*) dans le mélanome cutané (Karreth et al., 2011; Kumar et al., 2014). D'autres équipes vont plus loin dans la description de cette compétition et révèlent l'existence de pseudo-cibles pouvant titrer les miARN (Seitz, 2009), la possibilité d'inhiber les miARN par des constructions « éponges » anti-miARN exogènes (Ebert et al., 2007), mais aussi par la présence de MRE non canoniques dont la séquence est imparfaitement complémentaire à la séquence *seed* des miARN. Ces MRE non canoniques ne sont pas fonctionnels car la fixation de miARN à ces sites n'induit pas de répression de la traduction ni de dégradation du transcrit (Agarwal et al., 2015), sans toutefois évoquer que cela ait un impact sur la disponibilité des miARN pour les MRE canoniques.

Plus de 24 000 miARN sont référencés dans la base de données miRBase, parmis lesquels on retrouve 1 917 précurseurs et 2 654 miARN matures chez l'Homo sapiens (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014; Londin et al., 2015). Il a été recensé que plus de 60 % des gènes codant pour une protéine sont régulés par les miARN (Friedman et al., 2009; Guo et al., 2010). L'activité anormale d'un seul miARN, suite à une inhibition de fonction ou bien à sa surexpression, peut donc avoir un impact biologique important. Tout comme il est désormais établi que l'exacerbation ou au contraire l'inhibition

de l'expression d'un gène peut avoir pour conséquence la perturbation des fonctions biologiques qu'il pilote. Ainsi, le génome codant (ARNm) et le génome non codant (miARN, pseudogènes, ARNlnc) peuvent être impliqués dans la physiopathologie de maladies. Les fonctions physiologiques de ces acteurs telles que le développement, la prolifération, l'inflammation, l'apoptose… font l'objet de recherches approfondies pour mieux appréhender et définir les maladies, mais aussi pour mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques (Salmena et al., 2011).

2) Les miARN mimics

Les mimics sont des molécules d'ARN double brin, mimant les miARN endogènes matures. Ils sont donc des substituts moléculaires composés d'une séquence synthétique du miARN mature complexé à une séquence passagère permettant de les stabiliser lors de la transfection (figure 33). En effet, les acides nucléiques du brin passager sont chimiquement modifiés pour résister aux nucléases et réduire les potentielles hybridations. Mais leur administration nécessite tout de même une vectorisation avec un agent de transfection. Le brin guide anti-sens est quant à lui une fidèle copie du miARN endogène mature. L'objectif d'un mimic est d'accentuer ou de restaurer la fonction du miARN endogène. Une fois dans la cellule le complexe miARN s'associe avec RISC et la séquence passagère est alors clivée et exclue. Le miARN complexé à RISC va pouvoir se fixer sur son ARNm cible.

Ainsi comme leurs ascendants naturels, les mimics agissent sur plusieurs cibles ARNm cytoplasmiques *via* le complexe RISC, ce qui a pour conséquence que l'effet d'un mimic dans la cellule est donc multiple et peut être potentiellement difficilement maîtrisable (Ngamcherdtrakul et al., 2016).

3) Les miARN inhibiteurs

Les antagonistes de miARN ou antagomiR ou antimiR, quant à eux, représentent une classe d'oligonucléotides modifiés chimiquement, utilisés pour inhiber des miARN endogènes qui présentent un gain de fonction dans un contexte pathologique (figure 33). Leur utilisation est similaire à celle des siARN, même si les systèmes de régulation impliqués sont différents. Ils se lient avec une très forte affinité au miARN mature endogène qu'il cible. Le duplex ainsi formé sera ensuite dégradé. Grâce à une complémentarité parfaite à l'ARNm cible avec un mésappariement au site de clivage Ago2 ou une modification de base pour inhiber le clivage d'Ago2, ils permettent d'empêcher la fixation du miARN endogène sur le site ARNm cible. Cette fixation permet de prévenir la dégradation de l'ARNm cible par miRISC.

Les TSB sont des oligonucléotides anti-sens (ASO) élaborés pour se lier parfaitement à la région 3'-UTR de l'ARNm cible du miARN. La liaison du TSB sur l'ARNm en un site spécifique permet d'empêcher la fixation du miARN endogène. Cette dégradation permet de prévenir la dégradation de l'ARNm cible par miRISC.

Les éponges à miARN sont des constructions, ou des ARN, qui présentent plusieurs sites de fixation pour un miARN d'intérêt, ce qui permet de limiter sa disponibilité et donc son action sur les cibles associées.

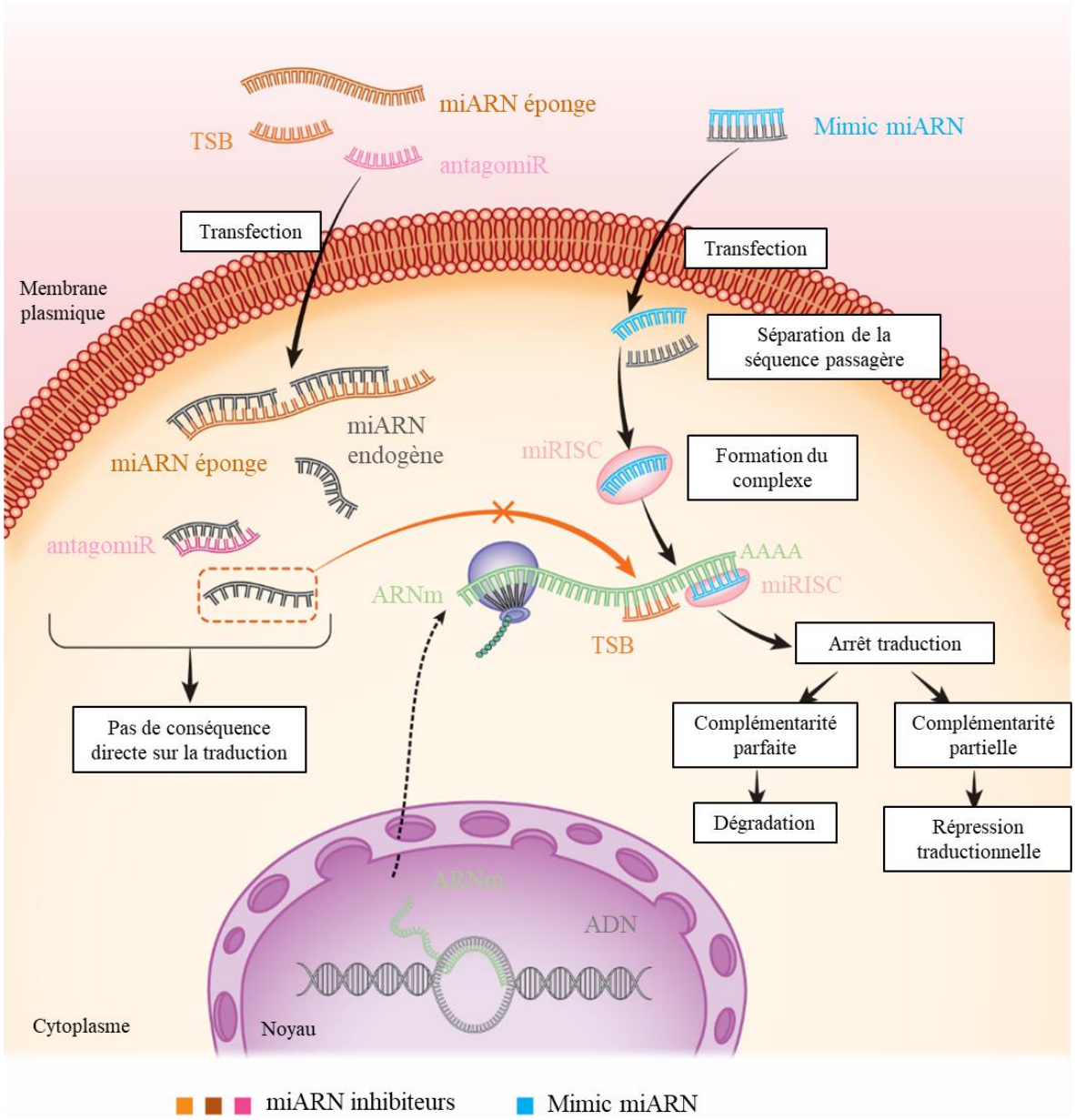


Figure 33 : Schéma représentant les différentes approches pour inhiber ou mimer un miARN. En condition physiologique : le miARN fixe la région 3'UTR de sa cible et inhibe la traduction entrainant soit la dégradation de l'ARNm et/ou son recyclage. Pour inhiber l'action d'un miARN, il y a trois possibilités : transfecter un (1) miARN inhibiteur (antagomiR) : le miARN inhibiteur fixe le miARN par complémentarité et prévient son action sur sa cible ; (2) TSB (*Target Site Blocker*) : le TSB lie spécifiquement le 3'UTR de l'ARNm cible au niveau du site de fixation du miARN, le miARN ne peut donc plus s'y fixer et ne peut exercer son action ; et (3) le miARN éponge : le miARN est saturé par le miARN éponge contenant plusieurs séquences complémentaires de fixation au miARN, le miARN ne peut donc plus se fixer à sa cible. Pour augmenter l'expression d'un miARN, la transfection d'un mimic de ce miARN est suffisante pour inhiber la traduction de l'ARNm (Bardin et al., 2018b).

5. Outils bio-informatiques pour la prédiction des sites cibles

L'étude de la régulation des miARN peut se faire par deux approches : gène-candidat ou globale par miRNome (*Small RNAseq*). Ces approches sont complémentaires et permettent de répondre à des problématiques différentes.

L'approche gène-candidat, empirique, se base sur des analyses *in silico* et nécessite une validation biologique. Des bases de données telles que DIANATool, TargetScan, miRWalk, MiRanda, PicTar, RNA22 ont été développées afin de prédire les cibles des miARN dans les régions 3'-UTR des ARNm chez les mammifères. Ces bases reposent sur plusieurs critères (Dweep et al., 2013; Peterson et al., 2014) tels que :

- L'appariement des bases entre le miARN et le 3'-UTR du gène cible
- La stabilité thermodynamique du duplexe miARN/3'-UTR du gène cible
- L'énergie libre
- La conservation des sites cibles entre espèces
- L'accessibilité du site cible et la coopération translationnelle
- La multiplicité des sites de liaison des miARN sur le même 3'-UTR cible

Pourtant chacune d'elles diffère en fonction de l'algorithme utilisé. Il est donc nécessaire d'effectuer les recherches sur plusieurs bases de données et de recouper les résultats.

L'approche globale vise à étudier l'ensemble des miARN exprimés différentiellement dans un ou plusieurs modèles sans *a priori*. Cette comparaison peut être effectuée par la méthode des *microarray*, par le séquençage NGS (*Next-Generation Sequencing*) ou la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) *array*.

6. MiARN et mucoviscidose

De nombreuses études se sont focalisées sur les miARN pouvant réguler l'expression de *CFTR* dans la mucoviscidose, mais l'essor de nouvelles études ces dernières années montrant la régulation d'autres cibles impliquées dans d'autres aspects cellulaires tels que l'inflammation, l'obstruction bronchique ou bien l'infection, ouvrent de nouvelles voies d'investigation (tableau 7 et 8).

1) Régulation de *CFTR* par les miARN

Gillen *et al.* ont été les premiers à identifier des miARN en lien avec l'activité de CFTR, dont plusieurs régulaient directement son expression en se fixant à l'extrémité 3'-UTR de son ARNm. La régulation de l'expression protéique de CFTR diffère en fonction du type cellulaire étudié. Elle est en effet tissu-spécifique et dépend du temps, ce qui rend complexe le développement des thérapies ciblant les miARN afin de restaurer la fonction de CFTR.

Ainsi, Viart *et al.* ont montré que la régulation de *CFTR* était différente avant et après la naissance, confirmant de précédents résultats (Marcorelles et al., 2007). En effet, le miR-101 régule négativement l'expression de CFTR dans les lignées cellulaires pulmonaires adultes, mais n'a aucun effet sur des cellules épithéliales bronchiques fœtales. Ce miARN semble jouer un rôle primordial, qui évolue au cours du temps (Viart et al., 2015). L'association de ce miARN avec le miR-494 permet de réprimer de manière remarquable l'expression de CFTR dans les embryons rénaux humains. Des analyses *in silico*, ont permis de montrer que ces deux miARN pouvaient cibler des ARNm de manière concomitante et par conséquent influencer la sévérité de la pathologie des patients CF (Megiorni et al., 2011). Le lien direct existant entre miARN et *CFTR* a, par la suite, été confirmé par d'autres équipes qui ont montré que les miR-145, miR-223 et miR-494, seuls ou de manière synergique, régulent directement l'expression de CFTR. C'est également le cas pour le miR-509-3p et le miR-494, qui induisent une plus forte répression de son expression (Oglesby et al., 2013; Ramachandran et al., 2013). Il a aussi été montré dans des progéniteurs de néphrons que le miR-19b cible directement *CFTR* (Phua et al., 2019).

En plus de pouvoir interagir directement avec *CFTR*, certains miARN peuvent également agir sur des acteurs intermédiaires de sa biosynthèse, comme le facteur de transcription *SIN3A* (*SIN3 transcription regulator family member A*), réprimé par le miR-138 (Ramachandran et al., 2012) ou bien sur des protéines chaperonne comme HSP90 (*Heat Shock Protein 90*) impliquées dans l'activité de repliement de la protéine CFTR (Kumar et al., 2015).

Les miARN peuvent également réguler l'expression d'autres canaux dont l'activité est modulée par CFTR, comme le co-transporteur NKCC1 (Na^+-K^+-$2Cl^-$- *cotransport protein*) (Gillen et al., 2011) ou le canal sodique ENaC (Kim et al., 2017). En effet, il a été montré que le miR-263 diminue l'expression d'ENaC dans les entérocytes, tout comme son orthologue le miR-183, capable de cibler les trois sous-unité d'ENaC. Il a aussi été montré que l'augmentation de l'expression de miR-9-5p était à l'origine d'une diminution de celle du canal chlorure ANO1 (Anoctamine-1), qui est activé par le calcium et contribue à moduler l'hydratation du mucus (Sonneville et al., 2017).

Des conditions particulières telles qu'une influence de polluants aériens ont permis de montrer que l'expression de CFTR diminue suite à une augmentation de l'expression de miR-101 et miR-144 dans les 16HBE14o$^-$ (Hassan et al., 2012) et en condition hypoxique l'augmentation de l'expression de miR-200b conduit aussi à une diminution de l'expression de CFTR (tableau 7).

ACTION	miARN	MODELES	REFERENCES	ANNEES
INDIRECT PAR SIN3A	miR-138	Cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide, Calu-3, HEK293, HeLa	Ramachandran et al.	2012
INDIRECT PAR HSP90	miR-16	Lignées cellulaires et culture primaires de cellules épithéliales CF	Kumar et al.	2015
DIRECT	miR-494, miR-384, miR-376b, miR-1246, miR-145, miR-331-3p et miR-939	Caco-2	Gillen et al.	2011
	miR-600, miR-494, miR-384, miR-1290, miR-1246, miR-145, miR-1827, miR-331-3p et miR-939	PANC-1		
	miR-600, miR-494, miR-607 et miR-384	16HBE14o-		
	miR-101, miR-494	HEK293	Megiorni et al.	
	miR-101, miR-144	16HBE14o-	Hassan et al.	2012
	miR-145, miR-223, miR-494	Brossages bronchiques, 16HBE14o-, CFBE41o-, HEK293	Oglesby et al.	2013
	miR-509-3p, miR-494	Cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide, Calu-3	Ramachandran et al.	
	miR-145, miR-384, miR-101, miR-600	A549	Viart et al.	2015
	miR-505, miR-943, miR-377, miR-384, miR-101, miR-600	Beas-2B		
	miR-600	HBEpiC		
	groupe miR-17-92	Macrophages humains	Tazi et al.	2016
	miR-145-5p	Calu-3	Fabbri et al.	2017
	miR-200b	Calu-3, 16HBE14o-	Bartoszewska et al.	
	miR-145	Cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide CF et non-CF	Lutful Kabir et al.	
	miR-19b	Progéniteurs de néphrons	Phua et al.	2019

Tableau 7 : Tableau représentant les miARN dérégulés liés directement ou indirectement à CFTR dans le contexte de la mucoviscidose.

Une cohorte de patients CF F508del homozygotes a été utilisée pour identifier des SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) potentiels dans le cluster miR-99b/let-7e/miR-125a contenus dans une région prédite pour contenir des gènes modificateurs. Les auteurs ont identifié trois polymorphismes dans ce cluster qui modulent l'expression de ces miARN et qui pourraient être associés aux phénotypes des patients (Endale Ahanda et al., 2015). Des polymorphismes présents dans la région 3'-UTR de CFTR permettent la fixation de miR-509-3p et de miR-433 et entraînent une diminution de l'expression de CFTR (Amato et al., 2013). Dans ce contexte, les auteurs ont aussi montré que l'utilisation d'un petit peptide nucléique modifié chimiquement afin d'augmenter sa résistance à la dégradation par les nucléases et complémentaire à la région *seed* du miR-509-3p, permet d'augmenter l'expression de CFTR (Amato et al., 2014).

Ces dernières années, des études montrant l'implication des miARN dans la régulation d'autres cibles que *CFTR* participant à des aspects différents de la pathologie, comme l'inflammation, l'obstruction bronchique ou l'infection, ont ouvert de nouvelles voies d'investigations.

2) Régulation des processus inflammatoires par les miARN

Dans le contexte de la mucoviscidose, une déshydratation du liquide de surface des voies aériennes entraîne un épaississement du mucus. L'hyperviscosité résultante, altère la clairance mucociliaire favorisant la colonisation bactérienne et la mise en place de cycles infection/inflammation. Dans ce contexte la voie de signalisation NF-κB est activée de façon anormale et aboutit à une augmentation de la sécrétion en IL-8, chimiokine clé impliquée dans le recrutement des neutrophiles.

Au niveau des voies aériennes, les processus inflammatoires contrôlés par NF-κB sont également régulés en partie par les miARN. En effet, miR-199a-3p régule directement IKKβ, qui agit sur la voie de signalisation NF-κB et par conséquent sur l'IL-8, la principale cytokine dérégulée dans les voies aériennes des patients CF (Bardin et al., 2018a). De plus, les miR-509-3p, miR-494 et miR-126 ciblent directement NF-κB (McKiernan et al., 2013; Ramachandran et al., 2013), et les miR-93 et miR-17 régulent la production d'IL-8 dans des cellules épithéliales bronchiques (Fabbri et al., 2014; Oglesby et al., 2015). L'expression et la fonction de CFTR diminuent également lorsque NF-κB est fonctionnelle (Ramachandran et al., 2013). Bhattacharyva *et al*. ont ainsi montré que l'expression de miR-155 était associée à l'activité de CFTR. Ce miARN peut réguler directement SHIP1 (*SH-2 containing Inositol 5' Polyphosphatase 1*) et altérer indirectement la production d'IL-8 *via* l'activation de la voie de signalisation impliquant PI3K/Akt et l'inhibition de celle des MAPK (Bhattacharyya et al., 2011). L'origine de la dérégulation de l'expression de miR-155 dans des cellules CF est médiée par les protéines TTP (*TrisTetrapoline*) et KSRP (*KH-type Splicing Regulatory Protein*) connues pour réguler la biogénèse des miARN (Bhattacharyya et al., 2013).

Mais l'expression des miR-509-3p et miR-494 a aussi été trouvée comme augmentée suite à des stimulations pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β) ou infectieuses (*S. aureus*) *via* la voie NF-κB (Ramachandran et al., 2013).

Certains miARN peuvent participer au remodelage de l'épithélium pulmonaire et avoir un rôle majeur dans le développement de la physiopathologie de la maladie. L'expression de miR-449 dans l'épithélium respiratoire est indispensable pour induire une inhibition directe de la voie Notch et une modulation de celle impliquant les petites GTPases, deux évènements nécessaires pour la fabrication des cils motiles, dont le battement permet l'évacuation du mucus (Chevalier et al., 2015; Marcet et al., 2011). Le remodelage de l'épithélium pulmonaire peut également être provoqué par des dérégulations de la voie du TGF-β, tant au niveau de l'expression de ses récepteurs (TGF-βR1 et R2), que d'intermédiaires de signalisation comme RPTOR ou des protéines SMAD, respectivement *via* les miR-1343, miR-155, miR-145 et miR-224-5p affectant ainsi les marqueurs fibrotiques, la migration cellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse (Fabbri et al., 2017; McKiernan et al., 2018; Stolzenburg et al., 2016).

La dérégulation du miR-31 dans les VA des patients atteints de mucoviscidose contribue à l'inflammation pulmonaire en augmentant l'activité de la cathepsine 5 qui dégrade les protéines antimicrobiennes (Weldon et al., 2014). Le miR-221 contrôle, quant à lui, le facteur de transcription *ATF6* qui est impliqué dans l'inflammation engendrée par le stress du RE (Oglesby et al., 2015).

Le miR-199a-5p régule CAV1, un régulateur négatif de la voie de signalisation TLR4 et impliqué dans les processus de résolution de l'inflammation, en ciblant l'axe PI3K/Akt/CAV1 (Zhang et al., 2015) et la voie du TGF-β (Lino Cardenas et al., 2013). A noter que le Celecoxib, qui module l'axe Akt/miR-199a-5p/CAV1, améliore chez les patients l'hyper-inflammation pulmonaire due aux macrophages. Le miR-181b régule l'expression d'ALX/FPR2, un récepteur de surface cellulaire reconnu par la molécule de résolution de l'inflammation : la lipoxine A4 (Pierdomenico et al., 2017) (tableau 8).

miARN	CIBLES	MODELES	REFERENCES	ANNEES
miR-126	TOM1 *Target of Myb1 Membrane Trafficking Protein*	Brossages bronchiques, 16HBE14o-, CFBE41o-, HEK293	Oglesby et al.	2010
miR-155	SHIP1 (indirecte : IL-8) *SH-2 containing inositol 5' polyphosphatase 1*	IB-3, S9	Bhattacharyya et al.	2011
miR-101, miR-1246, miR-494 et miR-384	SLC12A2 *Solute Carrier family 13 Member 2*	PANC-1	Gillen et al.	
miR-449	Notch1 *Notch homolog 1*	Cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide (ALI)	Marcet et al.	
miR-146a	MU5AC *Mucin 5 AC*	16HBE14o-	Zhong et al.	
miR-1	miR-155 (activé par TTP *TrisTetraPolin*)	Cellules épithéliales pulmonaires CF	Bhattacharyya et al.	2013
miR-145	SMAD3 *Mothers Against Decapentaplegic homolog 3*	Epithélium nasal de patients, HEK293	Megiorni et al.	
miR-31	IRF1 (indirecte: Cathepsine 5) *Interferon Regulatory Factor 1*	ALI, 16HBE14o-, CFBE41o-	Weldon et al.	2014
miR-93	IL-8 *Interleukine-8*	IB3, CuFi-1, NuLi-1	Fabbri et al.	
miR-17	IL-8	Brossages bronchiques, 16HBE14o-, CFBE41o-, HEK293	Oglesby et al.	2015
miR-221	ATF6 *Activating Transcription Factor 6*			
miR-199a-5p	CAV1 *Caveoline 1*	Macrophages alvéolaires souris et humains	Zhang et al.	
miR-183	SCNN1α, β, γ *Sodium Channel Epithelial 1 alpha, beta, gamma subunit*	CFBE41o-	Kim et al.	2016
miR-155	RPTOR *Regulatory Associated Protein of mTOR complex 1*	IB3, S9	Tsuchiya et al.	
miR-199a-5p	TβRII *TGF beta receptor II*	Cellules hépatiques stellaires	Zhang et al.	
miR-1343	Récepteur TGF-β	A549, 16HBE14o-, Caco-2	Stolzenburg et al.	

miR-17	ATG7, ATG16L1 *AuTophaGy related 7, 16 like 1*	Macrophage CF primaire humain et murin	Tazi et al.	
miR-145	TGF-β *Transforming growth factor beta*	Cellules primaires humaines CF et non CF	Lutful et al.	2017
miR-9-5p	ANO1 *Anoctamine 1 (TMEM16A)*	16HBE14o-, CFBE41o-	Sonneville et al.	
miR-181b	ALX/FPR2 *Lipoxin A4 receptor/formyl-peptide receptor type 2*	Macrophage dérivé de monocyte primaire CF, CFBE	Pierdomenico et al.	
miR-199a-3p	IKBKB *Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in beta cells, kinase beta*	CFBE41o-	Bardin et al.	2018
miR-224-5p	SMAD4	Monocytes CF et non-CF	McKiernan	

Tableau 8 : Tableau représentant les miARN dérégulés ciblant d'autres cibles que CFTR dans le contexte de la mucoviscidose.

3) Régulation de l'obstruction bronchique et de l'infection par les miARN

Les miARN sont capables de moduler l'expression de gènes qui participent à l'obstruction bronchique et à la production de mucus, comme *MUC5AC*, qui code l'une des principales mucines pulmonaires. La production de la mucine MUC5AC, composant majeur du mucus est initiée suite à une stimulation par de l'élastase de PNN mais le miR-146a peut aussi moduler son expression (Zhong et al., 2011). L'expression de miR-101 au niveau des VA des patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive est augmentée suite à la consommation de cigarette chronique et contribue à la diminution des niveaux d'expression de CFTR (Hassan et al., 2012).

L'expression des miARN est également influencée par des facteurs extérieurs, comme des bactéries pathogènes, telles que *H. influenza*, *S. aureus* ou *P. aeruginosa* (Oglesby et al., 2013; Ramachandran et al., 2013). En contexte infectieux (par exemple en présence de *P. aeruginosa*), l'expression de miR-93, qui est diminuée, est associée à une stabilisation de l'ARNm de l'IL-8 contribuant ainsi au maintien de l'état inflammatoire (Fabbri et al., 2014).

En contraste avec les LBA CF, le miR-17 est trouvé comme étant augmenté dans des macrophages CF primaires humains et murins et la perte du cluster miRc-1/miR-17-92 de ces cellules entraîne une augmentation du miR-17 ciblant ATG7 et ATG16L1.

L'inhibition de ce miARN dans des poumons de souris CF a permis de mettre en évidence une augmentation d'ATG7 et ATG16L1, ainsi qu'une amélioration de l'activité autophagique et donc de la clairance bactérienne (Tazi et al., 2016). Même si l'expression du *cluster* n'est pas altérée dans les PNN ou le plasma des patients CF, elle est corrélée positivement avec les exacerbations pulmonaires et négativement avec la fonction pulmonaire (Krause et al., 2018).

7. MiARN : biomarqueur et thérapies

1) MiARN : biomarqueur

a. Généralités

Les biomarqueurs permettant d'améliorer le dépistage, le diagnostic, le pronostic ou d'appréhender la réponse des patients de manière individuelle à un traitement donné, représentent un enjeu actuel concernant tous les domaines de la médecine moderne. Un biomarqueur doit être fiable, sensible et peu invasif. La caractérisation des miARN pourrait aider à l'établissement d'un diagnostic ou d'un pronostic, basé sur le fait qu'un miARN spécifique d'une pathologie pourrait être identifié dans les fluides extracellulaires corporels, comme le sérum, le plasma ou la salive, comme potentiel biomarqueur (Cook et al., 2015; Hu et al., 2014; Llano-Diez et al., 2017; Waller et al., 2017) du fait de leur stabilité (Chen et al., 2008b; El-Hefnawy et al., 2004).

La présence des miARN dans les fluides corporels se base sur le postulat que les miARN extracellulaires sont encapsulés dans des complexes à base de lipide, comme les microvésicules (Hunter et al., 2008), les exosomes (Valadi et al., 2007), dans des corps apoptotiques (Zernecke et al., 2009) ou des lipoprotéines (Baulande et al., 2014; Vickers et al., 2011) ou tout simplement complexés aux protéines argonautes, Ago2 le plus souvent (Arroyo et al., 2011) et peuvent être retrouvés à distance de la cellule où ils exercent leur actions (Grasedieck et al., 2013; Weiland et al., 2012).

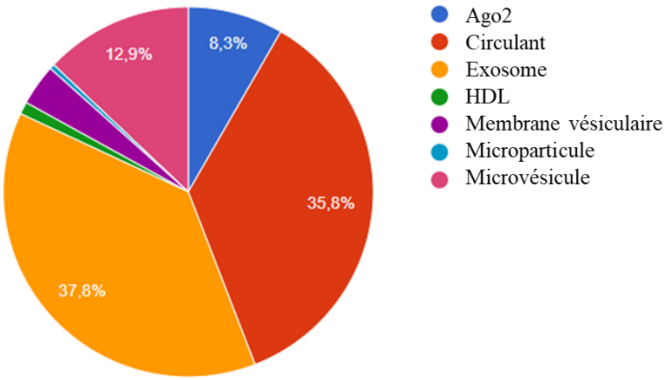


Figure 34 : Schéma représentant les ARN parmi les formes extracellulaires. Le terme « circulant » est utilisé lorsque les auteurs ne spécifient pas la forme exARN (d'après http://mirandola.iit.cnr.it/statistics.php).

Tout comme il existe des bases de données recensant les interactions possibles entre les miARN et les ARNm, il existe aussi une base de données des miARN circulants, miRandola (http://mirandola.iit.cnr.it/statistics.php) (figure 34). De nombreux fluides biologiques contiennent des quantités significatives et stables de miARN dont les profils d'expression varient d'un fluide à l'autre (Weber et al., 2010) (tableau 9). La base de données *Exocarta*, elle, recense les miARN qui sont sécrétés dans le milieu extracellulaire en association avec des microvésicules (http://exocarta.org/) (Mathivanan et al., 2012). Ces miARN présents dans les fluides biologiques pourraient représenter un outil thérapeutique important en tant que biomarqueurs.

Nature du fluide	Liquide amniotique	Lait maternel	Lavage bronchique	Liquide céphalo-rachidien	Colostrum	Liquide péritonéal	Plasma	Liquide pleural	Salive	Liquide séminal	Larmes	Urine
Concentration (µg/L)	570	47 240	1 128	111	585	775	308	470	1 945	17 770	564	94
Nombre de miARN détectés	359	429	260	212	386	397	349	210	548	436	320	204
Les 10 miARN les plus abondants	miR-518e miR-335 miR-302cb miR-515-3p miR-452b miR-892a miR-671-5p miR-515-5p miR-137 miR-593b	miR-335 miR-26a-2 miR-181d miR-509-5p miR-524-5p miR-137 miR-26a miR-595b miR-580 miR-130a	miR-515-3p miR-335 miR-509-5p miR-616 miR-545 miR-302d miR-223 miR-25 miR-134 miR-483-5p	miR-335 miR-515-3p miR-892a miR-873 miR-509-5p miR-223 miR-302d miR-616 miR-483-5p miR-134	miR-509-5p miR-181d miR-335 miR-518e miR-515-5p miR-223 miR-671-5p miR-873 miR-483-5p miR-186b	miR-515-3p miR-892a miR-518e miR-134 miR-509-5p miR-223 miR-515-5p miR-616 miR-302d miR-873	miR-335 miR-325 miR-377 miR-586b miR-518e let-7i miR-539 miR-616 miR-302d miR-589	miR-515-3p miR-892a miR-223 miR-616 miR-873 miR-335 miR-302d miR-134 miR-509-5p miR-589	miR-335 miR-892a miR-515-3p miR-545 miR-27ab miR-518e miR-509-5p miR-492b miR-483-5p miR-923	miR-518e miR-590-3p miR-588b miR-873 miR-590-5p miR-197b miR-218 miR-515-5p miR-137 miR-335	miR-335 miR-515-3p miR-137 miR-509-5p miR-590-5p miR-873 miR-892a miR-223 miR-302d miR-590-5p	miR-515-3p miR-335 miR-892a miR-509-5p miR-223 miR-873 miR-302d miR-616 miR-134 miR-923
miARN spécifiques du type de fluide	miR-636 miR-92a-1 miR-376b miR-26b miR-556-5p miR-593	miR-193b miR-10a miR-28-5p miR-924 miR-150 miR-518c miR-217		miR-577	miR-18a miR-513a-5p miR-10b miR-192 miR-193b miR-130a	miR-129 miR-583 miR-223 miR-627 miR-29b-1	miR-224 miR-483-3p miR-518f miR-508-3p miR-551b miR-182 miR-135 miR-139-3p miR-801 miR-369-3p miR-519d miR-299-5p miR-373 miR-330-5p		miR-182 miR-450b-5p miR-622 miR-141 miR-26a miR-145 miR-135b miR-381 miR-96 miR-1228 miR-431	miR-508-5p miR-644 miR-17 miR-380 miR-29b-2 miR-340	miR-637	

Tableau 9 : Caractérisation des miARN présents dans 12 fluides biologiques. Dans chacun des fluides testés, la quantité des miARN a été estimée, ainsi que le contenu en miARN. Les miARN les plus fréquemment retrouvés sont indiqués, ainsi que ceux qui sont spécifiquement retrouvés dans un seul fluide testé. L'identification des miARN a été faite à partir d'un panel partiel contenant 714 miARN (tableau de (Baulande et al., 2014) d'après (Weber et al., 2010)).

b. Applications

Les miARN sont stables dans le sérum ou le plasma malgré la présence de ribonucléases dans le sang et peuvent résister à une digestion par de la RNase A, à de nombreux cycles de congélation/décongélation et sont insensibles aux modifications de pH (Chen et al., 2008b; Mitchell et al., 2008). Des différences d'expression de miARN issus de sérum peuvent séparer correctement les individus sains des individus malades (Cook et al., 2015) et même distinguer différents stades d'une pathologie (Calvopina et al., 2018). Le premier miARN retrouvé comme étant exprimé de manière aberrante dans le cancer du poumon, let-7, fut identifié en 2004. Sa faible expression était associée à un faible taux de survie des patients ayant subi une résection chirurgicale d'un cancer du poumon à petites cellules (Takamizawa et al., 2004). Cette variation dans l'expression d'un miARN peut être soit due à un relargage passif des miARN lié à une lyse cellulaire provoquée par la maladie, soit le miARN pourrait avoir un rôle pathogénique et participer à l'évolution de la maladie.

Le profil d'expression des miARN dans le sang peut diagnostiquer différents types de maladies (cancer du poumon, de la prostate, des ovaires, pancréatite, BPCO, sarcoïdose…). Une étude multicentrique a montré que 62 miARN sont dérégulés sur les 863 étudiés par puce *microarray* dans au moins six maladies comparé à leur expression dans les plasmas des individus sains (Keller et al., 2011). L'analyse des voies de signalisation a confirmé l'association de la maladie avec la dérégulation des miARN. De plus, la localisation génomique des variants génétiques associés à la maladie corrèle avec les miARN dérégulés. Reposant sur le principe des miARN circulants, un panel de dix miARN a été mis en évidence comme pouvant prédire le développement d'un cancer du poumon non à petites cellules chez plus de 600 patients à partir d'une étude rétrospective, presque trois ans avant le diagnostic officiel (Chen et al., 2012). Un test utilisant la signature de huit miARN a même été produit par la société *Rosetta Genomics*, sous le nom de *miRview*, pour diagnostiquer les quatre principales classes de cancer du poumon à partir d'une biopsie avec une précision de 94 % (Gilad et al., 2012). L'augmentation de l'expression de certains miARN peut aussi corréler avec la fonction respiratoire des patients, comme pour le miR-199a-5p dont les niveaux dans des PNN de patients asthmatiques corrèlent avec la fonction respiratoire (Huang et al., 2018).

Actuellement, il n'y a pas d'étude recensant des miARN extracellulaires biomarqueurs dans la mucoviscidose. Cependant, des miARN circulants, incluant le miR-21, miR-122, miR-25 apparaissent comme étant différentiellement exprimés dans ce contexte (Cook et al., 2015). Une étude portant sur la signature des miARN circulants chez des enfants CF présentant un risque de développer une CFLD a été effectuée.

L'expression des miARN a été mesurée par PCR *array* puis validée par RT-qPCR (*Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction*) pour des échantillons de sérum d'enfants CF avec CFLD, des enfants CF sans CFLD (CFnoLD) et des enfants sains. Une combinaison de deux miARN (miR-122 – miR-25) permet de discriminer les enfants CF avec ou sans CFLD avec une spécificité de 92 % et une sensibilité de 40 %. En ajoutant un troisième miARN à la combinaison (miR-21), on augmente la spécificité à 94 % et la sensibilité à 47 % (Cook et al., 2015). La mesure de la combinaison de ces trois miARN, par une méthode rapide et non invasive, permettrait un diagnostic précoce de la CFLD et par conséquence une prise en charge plus rapide et adaptée.

Plus récemment, une étude portant sur le même principe que celle de Cook *et al.*, montre une augmentation de trois miARN, miR-122-5p – miR-365a-3p – miR-34a-5p et une diminution de miR-142-3p – let-7g-5p chez les patients CFLD comparés aux patients CFnoLD (Calvopina et al., 2018). L'association de miR-365a-3p – miR-142-3p – let-7g-5p permet de prédire l'atteinte hépatique chez les patients CF avec une spécificité de 92 % et une sensibilité de 83 %. Enfin, l'expression d'un seul miARN, le miR-18a-5p, pourrait permettre de distinguer les fibroses sévères des modérées avec une spécificité de 73 % et une sensibilité de 93 %.

Des miARN circulants dans la salive, incluant les miARN du *cluster* miRc-1/miR-17-92 apparaissent comme étant de potentiels biomarqueurs du statut respiratoire des patients CF puisque leurs expressions différentielles corrèlent avec la fonction pulmonaire et plus particulièrement lors de périodes d'exacerbations (Krause et al., 2018).

2) MiARN : perspectives thérapeutiques

Les miARN sont aujourd'hui considérés comme des cibles thérapeutiques potentielles (Levin, 2019). Deux approches ont été développées en se basant sur leur utilisation : les antagonistes (inhibiteurs, TSB et éponges à miARN) et les mimics des miARN (figure 33).

a. Thérapies de remplacement

Les mimics de miARN sont des ARN mimant les molécules endogènes et permettant d'amplifier leur fonction et sont utilisés pour restaurer une perte de fonction. Cette approche dite « thérapie de remplacement de miARN » vise à réintroduire des miARN dont l'expression est diminuée dans un contexte pathologique. La preuve de concept de cette thérapie de remplacement de miARN a été démontrée avec l'utilisation de miARN suppresseurs de tumeur, qui stimulent des voies de signalisation anti-oncogéniques conduisant à l'éradication de cellules tumorales (Takeshita et al., 2010; Wiggins et al., 2010). Des mimics de let-7 et miR-34 sont actuellement en phase de développement clinique pour cibler un large spectre de tumeurs (Bader, 2012; Trang et al., 2010).

La première molécule ayant pour but d'augmenter l'expression du miR-34 par l'utilisation d'un mimic (MRX34), est entrée en essai clinique de phase 1 en 2013, dans le cadre d'études concernant des tumeurs solides multiples (Bouchie, 2013). Ce traitement avec une prémédication à la dexaméthasone est associé à une tolérance acceptable entraînant une activité anti-tumorale (Beg et al., 2017). Des schémas posologiques sont en cours d'exploration pour améliorer sa tolérance. La principale limite de cette approche est la difficulté de formulation du mimic pour sa délivrance aux cellules cibles. Une des stratégies existantes pour y remédier est leur couplage à des nanoparticules. Dans l'essai clinique utilisant le MRX34, le mimic est encapsulé dans un système de délivrance formé de liposomes afin de faciliter son absorption par les cellules cibles (Bouchie, 2013). Une approche alternative consisterait à utiliser une délivrance par des vecteurs d'expression de miARN utilisant une infection par adénovirus comme précédemment décrit dans une approche thérapeutique pour le cancer (Kota and Balasubramanian, 2010).

b. Thérapies de blocage

Les antagonistes de miARN, quant à eux, sont utilisés pour inhiber des miARN endogènes qui présentent un gain de fonction dans un contexte pathologique. Ces thérapies sont similaires à l'utilisation de siARN, même si les systèmes de régulation impliqués sont différents.

L'antagoniste de miARN se lie avec une très forte affinité au miARN mature qu'il cible. Le duplex ainsi formé sera ensuite dégradé. L'inconvénient majeur de ce type de thérapie provient du fait qu'un miARN peut réguler l'expression de plusieurs gènes. L'inhibition d'un miARN, non spécifique d'un gène particulier, peut entraîner de nombreux effets secondaires. Les TSB sont des ASO élaborés pour se lier parfaitement à la région 3'-UTR de l'ARNm cible du miARN. Les récents développements réalisés sur les miARN ont permis d'accélérer l'évolution des méthodes et de modifications chimiques qui permettent d'inhiber les miARN de façon stable et d'optimiser leur délivrance. Il s'agit des LNA (*Locked Nucleic Acid*) (Wahlestedt et al., 2000), des groupes 2'-O-methyl (Krützfeldt et al., 2005), des PNA (*Peptide Nucleic Acid*), des groupements phosphorothioates, des éponges à miARN et des systèmes d'empaquetage comme les nanoparticules, les liposomes et les polymères (Kouri et al., 2015; McKiernan et al., 2013; Nguyen and Chang, 2017; Wu et al., 2011).

Les oligonucléotides phosphorothioates augmentent la résistance à l'hydrolyse 3'exonucléase, se lient plus facilement et avec une plus grande affinité aux protéines que les oligonucléotides anti-sens avec un lien phosphodiester présent naturellement sur l'ADN et l'ARN (Crooke et al., 2017; Gilar et al., 1998).

La base constituant le LNA est un analogue d'acide nucléique dans lequel l'anneau de ribose est modifié chimiquement par l'introduction d'un pont méthylène. Cette modification chimique permet d'apporter à la molécule une grande stabilité thermodynamique et empêche sa dégradation par les nucléases en renforçant son affinité pour sa cible (Lindow and Kauppinen, 2012). Un LNA-antimiR, contre miR-155 (MRG-106) par exemple, est actuellement testé pour les hémopathies malignes (Rupaimoole and Slack, 2017). Cet antimiR-155 contribue à l'amélioration des lésions cutanées et aux changements transcriptionnels compatibles avec l'activité de l'ARNm cible dans l'étude clinique de phase 1.

Les PNA sont des molécules synthétiques, analogues des acides nucléiques dans lesquelles le squelette phosphatidique est remplacé par une chaîne pseudopeptidique sur laquelle les bases puriques et pyrimidiques sont fixées par des liaisons carboxyliques (Pellestor et al., 2005). Les PNA n'étant pas chargés, il n'y a pas de répulsion électrostatique lors de l'hybridation d'une molécule avec une séquence complémentaire d'acides nucléiques et donc les duplex PNA/ADN ou PNA/ARN présentent un appariement spécifique plus stable que les duplex naturels. La structure de leurs molécules leur confère l'avantage de ne pas être dégradés par les nucléases ou protéases et reconnus par les polymérases. Aussi, elles ne peuvent pas être directement utilisées comme amorces ou copiées *in situ* et présentent donc une longue durée de vie (Ray and Norden, 2000). Dans le contexte de la mucoviscidose, l'utilisation d'un PNA ciblant miR-145-5p permet d'augmenter l'expression protéique de CFTR (Fabbri et al., 2017; Finotti et al., 2019). Son utilisation pourrait être considérée pour les patients CF portant les mutations des classes 4, 5 et 6 mais concernant les classes 1, 2, 3, elle devra être envisagée en combinaison avec d'autres protocoles thérapeutiques.

Les éponges à miARN sont des constructions, ou des ARN, qui présentent plusieurs sites de fixation pour un miARN d'intérêt, ce qui permet de limiter sa disponibilité et donc son action sur les cibles associées. Dans le mélanome, l'ARN de *TYRP1* (*TYrosinase-Related Protein 1*) agit comme une éponge qui, en s'associant au miR-16, limite son activité suppresseur de tumeur. L'inhibition des cibles par un bloqueur de fixation permet à miR-16 d'agir sur sa cible *RAB17* (*Ras-related protein Rab-17*, membre de la famille des oncogènes Ras) et d'empêcher la prolifération cellulaire (Gilot et al., 2017). Ce type d'approche utilisant les propriétés des éponges à miARN associés aux LNA pourrait être envisagé dans un but thérapeutique.

c. Voies d'administration

La principale voie d'administration pour les ASO pour des applications systémiques est par injection parentérale, incluant les injections intraveineuses ou sous-cutanée.

Par administration systémique les oligonucléotides simple brin modifiés avec un groupement phosphorothioate sont rapidement transférés du sang vers les tissus cibles (minutes/heures). Pour une administration par injection subcutanée, les ASO sont rapidement absorbés du site d'injection dans la circulation sanguine avec des concentrations plasmatiques maximales atteintes de façon constante en l'espace de 3-4 heures, suivie d'une phase d'élimination terminale beaucoup plus lente (demi-vie de plusieurs semaines). L'absorption cellulaire est principalement médiée par endocytose. La substitution d'un atome d'oxygène avec un atome de soufre plus hydrophobe, comme le phosphorothioate, augmente la stabilité et la liaison aux protéines plasmatiques, et par conséquent la biodisponibilité tissulaire (Yu et al., 2013).

Les propriétés pharmacocinétiques des ASO sont similaires à travers les espèces et le genre, facilitant le développement de médicament (Yu et al., 2007). Dans le cas des ASO de deuxième génération suite à une administration systémique et pour toutes les espèces animales évaluées, la répartition se fait dans la plupart des tissus tels que le foie, les reins, la moelle osseuse, les adipocytes (corps cellulaire mais pas la fraction lipidique), et les ganglions lymphatiques, à l'exception du système nerveux central (Geary et al., 2015). Une fois dans la cellule, les ASO présentent une longue demi-vie (2-4 semaines) et une activité prolongée dans la suppression ou la modification de l'expression de leur ARNm cible. Peu de données sont disponibles sur l'administration par voie orale, car cette stratégie nécessite une modification profonde de la formulation de l'ASO. Une étude *in vivo* a comparé l'administration intraveineuse et orale d'un médicament ASO et a démontré que le profil de distribution tissulaire était similaire suivant les deux voies d'administration, avec des concentrations plus élevées dans les reins puis le foie, les ganglions lymphatiques et la rate (Raoof et al., 2004). Dans le contexte de la mucoviscidose, des ASO inhalés pourraient être envisagés, permettant ainsi de cibler les poumons sans entraîner d'effets secondaires. Mais cette approche, réalisée uniquement par deux équipes ciblant les canaux ioniques chlorés avec une activité modifiée, apporte peu de retour (Crosby et al., 2017; Sonneville et al., 2017).

d. Applications thérapeutiques

Le premier antagomiR développé pour des études cliniques, le miravirsen (SPC3649), est un antimiR-122, qui cible et séquestre le miR-122 spécifique du foie. Le miR-122 se lie au 5'-UTR de l'ARNm du virus de l'hépatite C (HCV) qu'il stabilise, conduisant à l'accumulation du virus (Jopling et al., 2005). Le miravirsen présente l'avantage d'être couplé à une base LNA et de comporter des liaisons phosphorothioates. Il a été initialement testé chez la souris et les singes verts africains (Elmen et al., 2008). Son action a ensuite été examinée chez des chimpanzés infectés de manières chroniques par le HCV, et une diminution prolongée de la réplication du virus sans preuve de résistance virale ou d'effets secondaires, a été observée chez les animaux traités.

En 2011/2012, une étude de phase 2a a été réalisée chez des patients atteints d'HCV chronique qui ont reçu cinq injections par voie sous-cutanée par semaine, de miravirsen pendant une période de 29 jours. Cette étude clinique a montré une diminution prolongée, dose-dépendante des niveaux d'ARN viraux et de la cholestérolémie, ainsi qu'une modification de l'expression d'une centaine de gènes dans le foie (Janssen et al., 2013) et se poursuit dans les études de phase 2b.

Les niveaux d'ARN viraux sont devenus indétectables chez cinq patients, mais pour d'autres un rebond de l'expression du virus a été observé (van der Ree et al., 2014). La variabilité de réponses observée chez les patients suggère donc que des facteurs viraux et/ou l'hôte influencent la réponse au traitement par le miravirsen. Un changement de nucléotide : C3U, en 5'-UTR de l'ARNm de l'HCV a été mise en évidence chez les patients qui présentaient un rebond de réplication virale (Ottosen et al., 2015). Ce mutant est insensible au miravirsen et rendrait donc le virus indépendant du miR-122 qui utiliserait alors un mécanisme alternatif pour se stabiliser et se répliquer. La diminution plasmatique du miR-122 chez les patients est toujours observée deux mois après la dernière injection de miravirsen, sans doute en raison de la longue demi-vie du miravirsen dans les tissus (~ 30 jours) (Matthes et al., 2016). Deux compagnies pharmaceutiques (*Roche* et *Regulus Therapeutics*) sont actuellement impliquées dans des essais cliniques visant à traiter l'infection par le HCV en utilisant un antimiR-122.

Dans le contexte de la mucoviscidose, une équipe française a utilisé des TSB qui, en se liant au 3'-UTR de l'ARNm de *CFTR*, empêchent la fixation des miR-101 et miR-145. La transfection de ces molécules dans des cellules épithéliales bronchiques de patients CF conduit à une augmentation de l'expression et de l'activité de CFTR, suggérant que ces TSB pourraient être utilisés en thérapeutique (Viart et al., 2015).

La restauration de la fonction de CFTR par une modulation de l'épissage des ASO se développe (Igreja et al., 2016; Oren et al., 2017) comme par *SpliSense*, qui a mis au point une stratégie utilisant un 2' methoxy phosphorothioate SSO (*Splice-Switching Oligonucleotide*) contribuant à augmenter l'épissage correct de CFTR et par conséquent sa fonction canal dans des cellules épithéliales nasales. Cependant l'évaluation de cette approche nécessite des études plus poussées dans des modèles animaux.

En parallèle, d'autres cibles comme la protéine ANO1 impliquée, comme CFTR, dans la sécrétion d'ions chlorures, la régulation du pH et la fluidité du liquide de surface des VA sont envisagées (Jun et al., 2016; Ruffin et al., 2013). Un TSB empêchant spécifiquement la fixation de miR-9-5p sur le 3'-UTR de l'ARNm ANO1 permet, dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, d'augmenter son expression, l'activité chlorure, la migration cellulaire et la clairance mucociliaire. La restauration de ces paramètres, dérégulés à un niveau physiologique, permet de proposer le TSB ANO1 comme une cible thérapeutique potentielle dans le contexte de la mucoviscidose (Sonneville et al., 2017).

Chaque patient serait susceptible de pouvoir bénéficier de ce type d'approche conduisant à l'activation d'une sécrétion chlorure indépendante de CFTR. Dans cette étude, le TSB ANO1 a été administré par instillation intranasale à des souris mais si cette molécule devait être utilisée chez l'homme, son mode d'administration nécessiterait d'être déterminé. L'inhalation semble en effet la méthode la plus adaptée, l'atteinte pulmonaire étant prédominante chez les patients CF et en étant tissu-spécifique, elle présente une exposition systémique moindre, diminuant ainsi les risques d'effets secondaires. Cependant, les poumons des patients présentent des barrières, comme l'obstruction des VA par le mucus, pouvant rendre l'administration difficile. Le passage du TSB à travers le mucus reste donc à étudier.

La société *Ionis Pharmaceuticals* développe actuellement en préclinique un ASO ENaC composé d'une séquence de 16 nucléotides qui dégrade l'ARNm d'*ENaC* pulmonaire par voie inhalée (Crosby et al., 2017). Chez la souris, cet ASO ENaC contribue à diminuer les marqueurs d'expression du mucus, à améliorer la métaplasie des cellules *Goblet*, l'inflammation et l'hyper-réponse des VA sans effet sur le canal ENaC au niveau rénal, ni de toxicité. Il serait intéressant de voir comment différents groupes de patients ayant des mutations distinctes de *CFTR* répondent à une inhibition spécifiquement pulmonaire d'ENaC, notamment ceux qui ne peuvent prétendre aux modulateurs de CFTR.

OBJECTIF DU TRAVAIL

La mucoviscidose est une pathologie liée à la mutation du gène codant pour la protéine trans-membranaire, CFTR, qui est un canal Cl^- situé à la face apicale des épithélia sécréteurs. L'absence de cette protéine entraîne un déséquilibre ionique et hydrique menant à un épaississement du mucus et à l'altération de la clairance mucociliaire. L'hyperviscosité résultante favorise la colonisation bactérienne et la mise en place de cycles infection/inflammation qui sur le long terme vont dégrader l'épithélium pulmonaire. L'ensemble de ces symptômes participe aux troubles respiratoires à prédominance obstructive, qui sont la cause majeure de morbidité et de mortalité.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la régulation des protéines par les miARN, qui ont été découverts récemment et qui pourraient influencer la sévérité de la maladie en tant qu'acteurs de régulation. Il a notamment été montré que ces miARN pouvaient jouer un rôle dans l'inflammation pulmonaire de certaines pathologies et avoir donc un impact majeur au niveau pulmonaire dans la mucoviscidose.

L'objectif de ce travail était d'étudier le rôle des miARN dans la physiopathologie pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose.

La méthode utilisée se base sur deux approches complémentaires :

1. Stratégie globale, sans *a priori*, pour laquelle l'ensemble des miARN (*small RNAseq*) et des ARNm (*RNAseq*) des cellules épithéliales bronchiques issues de patients CF et de sujets sains (non-CF) ont été cultivées en interface air-liquide.
2. Stratégie ciblée, qui vise à étudier les miARN impliqués dans la régulation de protéines d'intérêt (base de prédiction bio-informatique de l'interaction entre un miARN et sa cible).

Les résultats du *small RNAseq* ont montré 11 miARN différentiellement exprimés entre les cellules CF et non-CF et aucun ne régule *CFTR*. Grâce à une analyse combinatoire, nous avons étudier le miR-199a-3p, dont l'expression est diminuée chez les patients CF et qui pourrait moduler 50 % des gènes dérégulés dans le *RNAseq* en agissant sur IKKβ, un acteur de la voie de signalisaiton NF-κB. Nous avons donc cherché à savoir si miR-199a-3p régulait IKKβ et jouait sur son expressison et par conséquent modulait l'activation de la voie NF-κB ainsi que la sécrétion en cytokines pro-inflammatoires dans des cellules épithéliales bronchiques CF. L'origine de la dérégulation de l'expression de miR-199a-3p, étant inconnue, nous nous sommes intéréssés à l'impact de la dysfonction intrinsèque de CFTR, aux modulations calciques, au contexte pro-inflammatoire et bien que le *small RNAseq* ait été effectué en dehors de tout contexte infectieux, nous avons étudié l'impact d'une infection par *Pseudomonas aeruginosa* pour déterminer si elle modulait aussi l'expression de ce miARN et donc aggraverait l'inflammation chronique retrouvée chez les patients CF.

Dans un second temps, nous avons étudié la régulation de l'inflammation par le miR-636, dont l'expression est augmentée chez les patients CF, sur trois acteurs : IL-1R1, TNFRSF11A et IKKβ ainsi que sur l'activation de la voie NF-κB et les sécrétions en IL-8 et IL-6 dans des cellules épithéliales bronchiques CF. Nous avons essayé de déterminer si les miARN pouvaient interagir entre eux, en modulant l'expression de l'un et en étudiant les conséquences sur l'expression de l'autre mais aussi sur l'activité de NF-κB, les sécrétions en IL-8 et IL-6.
Puis, nous avons déterminé, si les miARN étudiés dans ce projet, à savoir miR-199a-3p et miR-636 pouvaient être de potentiels biomarqueurs de l'inflammation chez les patients CF par rapport aux sujets sains en utilisant des plasmas et des neutrophiles.
Enfin, de nouveaux *small RNAseq* et *RNAseq* ont été effectués sur des cellules de patients CF stimulées ou non avec la combinaison de molécules Vx-809/Vx-770.

L'ensemble de ces résultats illustrent, le rôle pivot des miARN dans l'inflammation pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose

RESULTATS

I. Article : *Small RNA and transcriptome sequencing reveal the role of miR-199a-3p in inflammatory processes in cystic fibrosis airways*

Cet article a été publié dans *Journal of Pathology*.

1. Contexte de l'étude

L'atteinte pulmonaire présente chez les patients atteints de mucoviscidose est la première cause de morbidité et de mortalité. La déficience de la protéine CFTR ou de son activité à la face apicale des épithélia sécréteurs entraîne une déshydratation du liquide de surface des VA. L'hyperviscosité résultante altère la clairance mucociliaire, favorise la colonisation bactérienne et l'établissement de cycles infection/inflammation, qui sur le long terme dégradent l'épithélium pulmonaire conduisant à une insuffisance respiratoire chez les patients CF. L'inflammation chronique est la marque de l'atteinte pulmonaire CF avec la présence d'IL-8 et l'invasion de PNN, principalement causée par des modifications de l'activation de la voie NF-κB. NF-κB est un facteur de transcription nucléaire impliqué dans de nombreux processus cellulaires et jouant un rôle fondamental dans la réponse immunitaire, notamment par la sécrétion de cytokines, telles que l'IL-8. Dans la mucoviscidose, l'origine de la dérégulation de NF-κB reste incertaine, malgré de nombreuses publications. Pourtant cibler l'activation de la voie de signalisation NF-κB pourrait contribuer à une meilleure régulation de l'inflammation, avec une activation de ce processus uniquement en cas d'infection pulmonaire des patients CF et par conséquent arrêter les cycles infection/inflammation qui dégradent l'épithélium pulmonaire. Nous nous sommes donc intéressés aux miARN qui sont de petits ARN simple brin non codants qui régulent négativement l'expression des gènes de façon post-transcriptionnelle.

2. Résultats

Par un *RNAseq* (transcriptome), nous avons montré que 50 % des dix-huit ARNm dérégulés entre les cellules épithéliales bronchiques humaines cultivées en interface air-liquide CF et non-CF sont liés à la voie NF-κB. Par un *smallRNAseq* sur les mêmes cellules, nous avons montré onze miARN différentiellement exprimés parmi lesquels le miR-199a-3p, qui a une expression diminuée chez les patients CF par rapport aux patients non-CF (table 1). Les analyses bio-informatiques à l'aide de différentes bases de données (figure 1), nous ont permis de montrer que le miR-199a-3p est prédit par les bases de données bio-informatiques et validé dans d'autres modèles comme ayant pour cible le 3'-UTR d'IKKβ, une des protéines impliquées dans la voie NF-κB.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'expression de miR-199a-3p est diminuée et inversement corrélée à une augmentation de l'expression d'IKBKB et de l'IL-8 dans des explants bronchiques de patients CF comparés aux sujets sains non-CF (figure 2, table 2), confirmant les résultats du *small RNAseq* et *RNAseq*.

Pour déterminer si la régulation d'IKKβ par miR-199a-3p est une régulation directe, nous avons effectué des tests d'activité luciférase à l'aide d'un plasmide luciférase couplé au 3'-UTR d'*IKBKB* et nous avons observé une diminution significative de l'activité luciférase des cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-) lorsque miR-199a-3p est surexprimé (figure 3A et B) par rapport à la condition contrôle. Cette diminution démontre que miR-199a-3p régule IKKβ en se fixant sur son 3'-UTR. Aucune différence n'est observée lorsque les cellules sont transfectées avec un plasmide luciférase couplé au 3'-UTR d' *IKBKB* muté pour le site de fixation de miR-199a-3p. Nous avons montré que le miR-199a-3p module l'expression d'IKKβ *via* une intéraction directe sur le 3'-UTR de l'ARNm. Par la suite, nous voulions déterminer l'impact d'une surexpression de miR-199a-3p sur l'activation de la voie de signalisation NF-κB. Pour cela, nous avons surexprimé miR-199a-3p dans ces cellules, et montré que cela provoquait une diminution de l'expression protéique d'IKKβ, et de NF-κB, ainsi qu'une diminution de l'activité de NF-κB et de la sécrétion en IL-8 (figure 4).

Enfin, nous avons voulu vérifier si le miR-199a-3p pouvait être un potentiel biomarqueur entre les patients CF et les sujets sains non-CF. Cependant, nous avons montré qu'il n'y avait aucune différence significative entre les deux groupes (figure 5).

3. Conclusion

Cet article a permis de mettre en évidence la dérégulation de l'expression du miR-199a-3p dans les cellules CF par rapport aux non-CF. Ce miARN est capable de cibler et d'inhiber l'activation de la voie NF-κB *via* IKKβ et par ce biais régule 50 % des ARNm différentiellement exprimés retrouvés dans le *RNAseq*. En régulant l'une des voies de signalisation majeure de l'inflammation, le miR-199a-3p pourrait représenter une potentielle cible thérapeutique de régulation de ce processus. Cependant il reste indispensable de déterminer quelle est l'origine de la dérégulation de l'expression de miR-199a-3p.

4. Article

Journal of Pathology
J Pathol 2018; **245:** 410–420
Published online 20 June 2018 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/path.5095

ORIGINAL PAPER

Small RNA and transcriptome sequencing reveal the role of miR-199a-3p in inflammatory processes in cystic fibrosis airways

Pauline Bardin[1], Emmeline Marchal-Duval[1], Florence Sonneville[1], Sabine Blouquit-Laye[2], Nathalie Rousselet[1], Philippe Le Rouzic[1], Harriet Corvol[1,3] and Olivier Tabary[1]*

1 *Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, INSERM, Centre de Recherche Saint Antoine (CRSA), Paris, France*
2 *Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines, UFR des Sciences de la Santé, UMR 1173, Montigny-Le-Bretonneux, France*
3 *Hôpital Trousseau, Paediatric Respiratory Department, AP- HP, Paris, France*

**Correspondence to: Olivier Tabary, INSERM UMR_S 938, Centre de Recherche Saint Antoine (CRSA), Saint Antoine Hospital, 34 Rue Crozatier, 75012 Paris, France. E-mail: olivier.tabary@inserm.fr*

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is the most common lethal genetic disease, caused by CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) gene mutations. CF is characterized by an ionic imbalance and thickened mucus, which impair mucociliary clearance and promote bacterial colonization and the establishment of infection/inflammation cycles. However, the origin of this inflammation remains unclear, although microRNAs (miRNAs) are suspected to be involved. MiRNAs are small non-coding RNAs that bind to the 3′-untranslated regions (UTRs) of target gene mRNA, thereby repressing their translation and/or inducing their degradation. The goal of this study was to investigate the role of microRNAs associated with pulmonary inflammation in CF patients. Through the analysis of all miRNAs (*small RNAseq*) in human primary air–liquid interface cultures, we demonstrated that miR-199a-3p is the only miRNA downregulated in CF patients compared to controls. Moreover, through RNA sequencing (*RNAseq*) analysis, we showed that 50% of all deregulated mRNAs are linked directly or indirectly to the NF-κB pathway. To identify a specific target, we used bioinformatics analysis to predict whether miR-199a-3p targets the 3′-UTR of IKBKB, which encodes IKKβ, a major protein in the NF-κB pathway. Subsequently, we used bronchial explants from CF patients to show that miR-199a-3p expression is downregulated compared to controls and inversely correlated with increases in expression of IKKβ and IL-8. Through functional studies, we showed that miR-199a-3p modulates the expression of IKBKB through a direct interaction at its 3′-UTR in bronchial epithelial cells from CF patients. In miR-199a-3p overexpression experiments, we demonstrated that for CF cells, miR-199a-3p reduced IKKβ protein expression, NF-κB activity, and IL-8 secretion. Taken together, our findings show that miR-199a-3p plays a negative regulatory role in the NF-κB signalling pathway and that its low expression in CF patients contributes to chronic pulmonary inflammation.
Copyright © 2018 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: cystic fibrosis; lung; *small RNAseq*; *RNAseq*; miR-199a-3p; NF-κB

Received 31 October 2017; Revised 11 April 2018; Accepted 26 April 2018 *No conflicts of interest were declared.*

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is the most common lethal genetic disease in the Caucasian population [1], caused by mutations in the *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) gene [2]. *CFTR* encodes a chloride channel [3] essential for the osmotic balance of airway surface liquids. The most common mutation is F508del [4], resulting in the lack of the channel at the apical membranes of epithelial cells and leading to an ionic imbalance and thickened mucus [5]. The resulting hyperviscosity impairs mucociliary clearance, promoting bacterial colonization and the establishment of infection/inflammation cycles which, in the long term, degrade the pulmonary epithelium. Chronic inflammation is the hallmark of CF lung disease, with the presence of polynuclear neutrophil invasion and interleukin-8 (IL-8) in the airways of CF patients [6,7] mainly caused by changes in the NF-κB pathway [8,9]. NF-κB is a nuclear transcription factor involved in many cellular processes; it plays a fundamental role in the immune response, especially in the secretion of cytokines, such as IL-8, in the lungs. NF-κB is a dimeric transcription factor present in a latent form in cells and can be induced to bind to DNA at κB sites. The canonical pathway is usually induced by microbial or viral infections and/or pro-inflammatory cytokines, all of which activate the β-subunit of the IκB kinase (IKKβ) complex. IκB kinases (IKKs) phosphorylate IκB (inhibitors of κB) bound to NF-κB, resulting in the ubiquitin-dependent degradation of IκB and translocation of NF-κB dimers into the nucleus [10]. In CF, the origin

of the deregulation of NF-κB remains unclear, despite extensive publications in the field [11,12].

Here, therefore, we focused on microRNAs (miRNAs) as an alternative mechanism that has been suggested to regulate NF-κB [13–15]. MicroRNAs are small endogenous non-coding single-stranded RNAs (19–23 nucleotides) that negatively regulate gene expression. The control exerted by a miRNA on its target gene most commonly occurs through the 3′-untranslated region (UTR) of the mRNA, leading to inhibition of its translation [16]. miRNAs regulate more than 60% of human protein-coding genes; hence, they are implicated in normal physiological function [17]. Moreover, miRNAs play a critical role in many diseases, in which their expression is deregulated [18–21]. Many studies on CF have focused on the role of miRNAs in regulating *CFTR* gene expression [22], but few studies have compared miRNA expression levels between CF patients and non-CF controls. We aimed to understand the role of miRNAs in pulmonary physiopathology in CF patients in basal conditions. We assessed miRNAs and mRNA expression in bronchial cell specimens from CF patients and non-CF controls, and we also performed an experimental *in vitro* modulation of miRNA expression to elucidate miRNA/mRNA regulation in the context of CF by bioinformatics followed by functional analyses.

Materials and methods

Human bronchial epithelial cell culture

Human bronchial epithelial cells obtained from lung tissues removed during surgery and cultured at an air–liquid interface (ALI) were purchased from Epithelix (Plan-les-Ouates, Switzerland) [23]. Cells were cultured with MucilAir™ culture medium (Epithelix) for at least 8weeks. The permeability of tight junctions and differentiation were validated by transepithelial electrical resistance measurement (> 400 $\Omega.cm^2$) and cilia beating frequency (> 7Hz). Data were generated from human bronchial epithelial cells from five CF patients homozygous for the F508del mutation and five healthy donors (non-CF). The human bronchial epithelial cell line CFBE41o$^-$ (CF) was a gift from Professor DC Gruenert (UCSF, San Francisco, CA, USA). They were cultured in minimum essential medium (MEM) in the presence of Earle's salts and L-glutamine (Thermo Fisher, Villebon-sur-Yvette, France) containing 10% bovine growth serum (Eurobio, Les Ulis, France) and 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher). Cell cultures were grown and maintained at 37°C in a 5% CO_2 humidified incubator.

Human lung explants and plasma

Human lung explants were collected and processed in compliance with the current French public health legislation (L.1235-2 and L.1245-2 articles, http://www.legifrance.gouv.fr). Each participating institution informed the patients and ensured that they were not opposed to the use of surgical samples, removed during a medical act, for research purposes. Lung fragments were obtained from nine non-CF controls undergoing surgery (45±21years old) and from eight CF patients (homozygous for the F508del mutation; 35±9years old) undergoing lung transplantation. For non-CF controls, samples were obtained from a non-pathological area without inflammatory cells from patients with bronchial carcinoma. After tissue dissection, samples were directly frozen in liquid nitrogen before miRNA/RNA extraction.

Plasma samples were collected during annual blood tests from 26 non-CF controls (30±13years old) and 25 CF patients (homozygous for the F508del mutation; 15±3years old). The blood samples were centrifuged for 15min at 3000 × *g*. The plasma (supernatant) was harvested, aliquoted, and stored at −80°C until miRNA extraction.

mRNA and miRNA isolation, purification, library construction, and sequencing

Small RNAs (< 200nt) and large RNAs (> 200nt) were isolated using the NucleoSpin miRNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). RNA purification and library construction were performed as previously described by the *RNAseq* and epigenome facilities [24]. RNA sequencing (RNA-seq) was performed at the Institut Pasteur (Paris, France). We used 3μg of large RNAs to purify polyadenylated mRNA and to build an RNA library using the TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA). Ten samples were sequenced on a HiSeq 2000 sequencer (Illumina) in single-end mode to generate approximately 100 million reads of 50 bases per sample. Adapter sequences and low-quality sequences were removed using an in-house program (https://github.com/baj12/clean_ngs). Only sequences at least 25nt in length were considered for further analysis. TopHat (version 1.4.1.1, default parameters; http://ccb.jhu.edu/software/tophat) was used for alignment against the reference genome (hg19). Genes were counted using HTseq-count.

For *small RNAseq* analysis, miRNA-seq was performed at the Institute of Molecular and Cellular Pharmacology (IPMC, Valbonne, France) as described previously [25]. Briefly, small RNA libraries were constructed using a TruSeq small RNA sample preparation kit (Illumina). Small RNA-seq libraries were generated using 200ng of small RNAs as input from each sample. Using multiplexing, the platform combined up to four samples into a single lane to obtain sufficient coverage and ran two technical replicates for each library. T cluster generation was performed on a Flow Cell v3 (TruSeq SR Cluster Kit v3; Illumina) using cBOT. Sequencing was conducted on the HiSeq1000 platform [24]. The PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships; http://www.pantherdb.org/) classification system was used to classify genes identified

in our transcriptomics data according to their molecular functions annotated using ontology terms.

RNA-seq raw data files are available in the European Nucleotide Archive (ENA) (primary accession number PRJEB25563; http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB25563).

Predicted miRNA target

Several online algorithms (PicTar, TargetScan, miRBase, and miRWalk) were used to identify putative binding sites between the seed regions of miRNA and the mRNA of potential target genes. These algorithms are available online at https://pictar.mdc-berlin .de/, http://www.targetscan.org/vert_72/, http://www .mirbase.org/, and http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/.

Cell transfection

CFBE41o⁻ cell lines were transfected with miR-199a-3p mimic (5′-ACAGUAGUCUGCACAUUG GUUA-3′) or scramble mimic as the control (Thermo Fisher) using HiPerfect (Qiagen, Les Ulis, France) at 2.5, 10, 30, 50, and 100nM for 24, 48, and 72h. After transfection, cells were lysed for miRNA, RNA, or protein extraction.

miRNA and RNA extraction

For miRNA and RNA extraction from human lung explants, 100mg of pulmonary sample was crushed with a POLYTRON® sonde (PT 3 100; Kinematica, Luzern, Switzerland) in 1ml of TRIzol® (Life technologiess, Saint-Aubin, France) [26].

For cells, miRNA and RNA were extracted using a Nucleospin miRNA kit (Macherey-Nagel). For plasma samples, miRNA was extracted using a Nucleospin miRNA Plasma kit (Macherey-Nagel). RNA and miRNA were eluted with sterile water. The concentration and quality of the RNA and miRNA were evaluated using a NanoDrop spectrophotometer by absorbance at 260nm.

Reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis

The genes of interest, human miR-199a-3p, *IKBKB*, and *IL8*, as well as the endogenous controls *RNU6B*, miR-103, and *GAPDH*, were reverse-transcribed with the TaqMan microRNA and RNA reverse transcription kit using 20ng miRNA and 100ng RNA sample. qPCR was performed using a StepOnePlus™ thermocycler (Thermo Fisher) and TaqMan technology. For relative quantification, miRNA and RNA levels were calculated using the $2^{-\Delta CT}$ method and normalized to the expression levels of *RNU6B*, miR-103, and *GAPDH*. Each sample was assessed in triplicate.

Protein extraction and western blot analysis

Proteins were extracted using a lysing solution (anti-protease cocktail, Na_3VO_4, NaPPi). Total protein concentration was evaluated with a Qubit fluorometer (Thermo Fisher). Next, 20μg of total protein extract was reduced and size-separated on 10% SDS-polyacrylamide gels; transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France); blocked in TBS-T milk; and incubated with specific primary antibodies against IKKβ (#2884 at 1:1000), phospho-IκBα (#9246 at 1:1000), NF-κB (#6956 at 1:1000), and β-actin (#3700 at 1:10000) (Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA). The proteins of interest were detected, imaged, and quantified (Chemidoc, Bio-Rad, France).

Luciferase assay

An *IKBKB*-3′-UTR wild-type plasmid, *CGCCTTGT CTGCACACTGGAGGTCCTCCATT*, (supplementary material, Figure S1) and a mutated plasmid, *CGCCTT GTCTGCTGTGACCAGGTCCTCCATT*, were used for the luciferase assay (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). CF cells were seeded in six-well plates and transfected the next day with 1μg/ml of the *IKBKB* 3′-UTR using ExGen 500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Cells were co-transfected with 30nM miR-199a-3p mimic or scramble mimic as the control. Supernatants were collected 48h after co-transfection. For these experiments, we used a Secrete-Pair™ Dual Luminescence Assay kit (Genecopoeia, Tebu-bio), designed to analyse the activities of *Gaussia* luciferase (GLuc) and secreted embryonic alkaline phosphatase (seAP), an endogenous reporter, using the same samples from the cell culture medium.

NF-κB activity

Nuclear proteins were extracted from cells transfected with miR-199a-3p mimic or scramble mimic as the control using a Nuclear Extract kit (Active Motif, Rixensart, Belgium). Total protein concentration was evaluated with a Qubit fluorometer (Thermo Fisher). The transcriptional activity of p65 NF-κB in 20μg of nuclear protein extract from CFBE41o⁻ cells was assayed using the TransAM™ Transcription Factor Assay kit (Active Motif).

IL-8 assay (ELISA)

The supernatants of cells transfected with miR-199a-3p mimic or scramble mimic as the control were recovered 48h after transfection. The IL-8 concentration of each sample was determined with the human IL-8 Duo-Set kit (R&D Systems, Lille, France).

Statistical analysis

RNA-seq data counts were analysed using R version 3.0.2 and the Bioconductor package DESeq2 version 1.2.9 (http://www.bioconductor.org/). The generalized linear model included time and condition (CF versus non-CF). Extracted contrasts included comparisons between the CF and control groups, and pairwise

Table 1. *Small RNAseq* and *RNAseq* results, including significantly differentially expressed (A) miRNAs and (B) mRNAs in primary air–liquid interface-cultured cells from CF patients and non-CF controls

A	MicroRNA	Log FC	Raw *p*	*Padj*
Downregulated	hsa-miR-199a-3p	−2.565	5.23E-05	0.026
	hsa-miR-199b-3p	−2.555	5.54E-05	0.026
Upregulated	hsa-miR-449a	1.586	1.87E-04	0.043
	hsa-miR-449b-5p	1.628	1.51E-04	0.040
	hsa-miR-4516	1.733	3.49E-05	0.026
	hsa-miR-449b	1.734	2.19E-04	0.043
	hsa-miR-449c-5p	1.771	1.21E-04	0.036
	hsa-miR-2682-3p	2.124	2.36E-04	0.043
	hsa-miR-449c-3p	2.345	1.82E-05	0.022
	hsa-miR-636	2.533	7.99E-05	0.027
	hsa-miR-639	2.643	2.52E-06	0.006

B	mRNA	Log FC	Raw *p*	*Padj*	Genes related to the NF-κB pathway
Downregulated	*STC1*	−1.48	1.80E-09	2.60E-05	[51]
	UCHL1	−1.73	2.80E-06	9.00E-03	[52]
	FKBP10	−1.64	5.10E-06	1.40E-02	[53]
	SLC25A25	−0.53	6.50E-06	1.40E-02	–
	PDGFRA	−1.13	9.60E-06	1.70E-02	[54]
	ALDH1L2	−1.49	1.20E-05	1.70E-02	[55]
	GFPT2	−1.4	1.90E-05	2.20E-02	[56]
	AC005281.1	−1.33	1.80E-05	2.20E-02	–
	ZEB2	−1.08	2.90E-05	2.80E-02	[57]
	AP000688.8	−1.57	3.50E-05	3.30E-02	–
	RP11-178C3.2	−1.15	4.30E-05	3.60E-02	–
Upregulated	*ZFX*	0.64	2.10E-07	1.20E-03	–
	KDM6A	0.65	7.30E-07	3.50E-03	[58]
	SEMA3E	0.8	1.70E-06	7.30E-03	[59]
	RP11-706O15.1	0.81	4.20E-06	1.20E-02	–
	DDX3X	0.44	8.60E-06	1.60E-02	[60]
	HSD17B6	1.25	2.20E-05	2.30E-02	–
	TRAPPC2	0.54	4.10E-05	3.60E-02	[61]

FC = fold-change of absolute values; Raw *p*= raw *P* value after *small RNAseq* or *RNAseq* analysis; *Padj* =*P* value adjusted for multiple testing; *n*= 5 each group.

comparisons of time points in each condition. Raw *P* values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg procedure, and genes with an adjusted *P* value less than 0.001 were considered differentially expressed [24].

For functional analysis, all data are described as mean±SD. Between-group differences were assessed using the Mann–Whitney *U*-test, Student's *t*-test, and Pearsoncorrelations.Valuesof$p \leq 0.05$wereconsidered significant; in the figures, statistically significant differences are indicated for $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), and $p \leq 0.001$ (***).

Results

small RNAseq and *RNAseq* analyses

Differential expression of miRNA and mRNA between CF patients and non-CF controls was assessed by biostatistical analysis. Among the differentially expressed genes, we selected those whose fold change (FC) was ≥2 in upregulation and≤0.5 in downregulation. Eleven significantly differentially expressed miRNAs were observed when comparing miRNA expression levels between CF and non-CF cells, including nine upregulated miRNAs and two downregulated miRNAs in CF cells. In the same sample, eighteen significantly differentially expressed mRNAs were observed, including seven upregulated mRNAs and eleven downregulated mRNAs in CF cells (Table 1).

We speculated that the integration of both levels of transcript information should considerably enhance the conclusiveness of pathway analysis. Thus, by integrating both the miRNA and the mRNA profiles, we aimed to identify specific signalling pathways that account for these regulatory phenotypes; this experimental concept is outlined graphically in Figure 1. To detect miRNA–mRNA networks affecting CF cells, we combined experimentally validated mRNA and miRNA targets, as well as significantly deregulated genes, for pathway analysis using DAVID bioinformatics resources, including BioCarta and the KEGG database (Figure 1). Based on these analyses, we decided to focus our study on miR-199a-3p, a miRNA predicted and validated in other models to control the NF-κB pathway. As many as 50% of the RNAs found to be dysregulated in CF by the transcriptomic analysis are associated with this pathway.

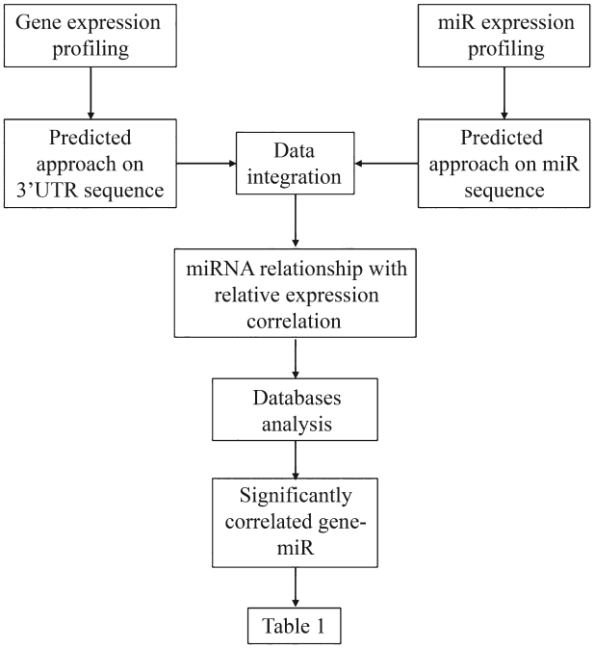


Figure 1. Flowchart of bioinformatics analyses. Differentially expressed genes/miRNAs were initially integrated through correlations of expression data or prediction by target databases. The two approaches were subsequently integrated to identify the most significant miRNA targets.

Expression of miR-199a-3p, *IKBKB*, and *IL8* in CF and non-CF bronchial tissues

To characterize and confirm the relevance of the chosen pathway in an *ex vivo* model, we first quantified the expression of miR-199a-3p, *IKBKB*, and *IL8* in human lungexplants fromCFpatients and non-CFcontrol biopsies using RT-qPCR. In the non-CF bronchial tissues, we observed that miR-199a-3p was expressed heterogeneously, due to inter-individual phenotypic variability (Figure 2A). In CF patients, miR-199a-3p expression was significantly lower, and *IKBKB* and *IL8* mRNA levels were elevated compared with those in non-CF controls (Figure 2A–C). According to Pearson's correlation analysis, there was a significant correlation between miR-199a-3p and *IKBKB/IL8* expression in non-CF patients, whereas miR-199a-3p expression was only correlated with *IKBKB* expression in CF patients ($p \leq 0.005$; Table 2). We analysed one miRNA that was unchanged between non-CF and CF cells. We randomly selected miR-23a from the list of the unchanged miRNAs. RT-qPCR revealed no significant difference in miR-23a expression between non-CF and CF cells (supplementary material, Figure S2), confirming the small RNA-seq results.

miR-199a-3p directly regulates *IKBKB*

In CF patients, we hypothesized that the expression of miR-199a-3p can modify *IL8* expression through the NF-κB pathway. To confirm this, CFBE cells were transfected with miR-199a-3p mimic at different

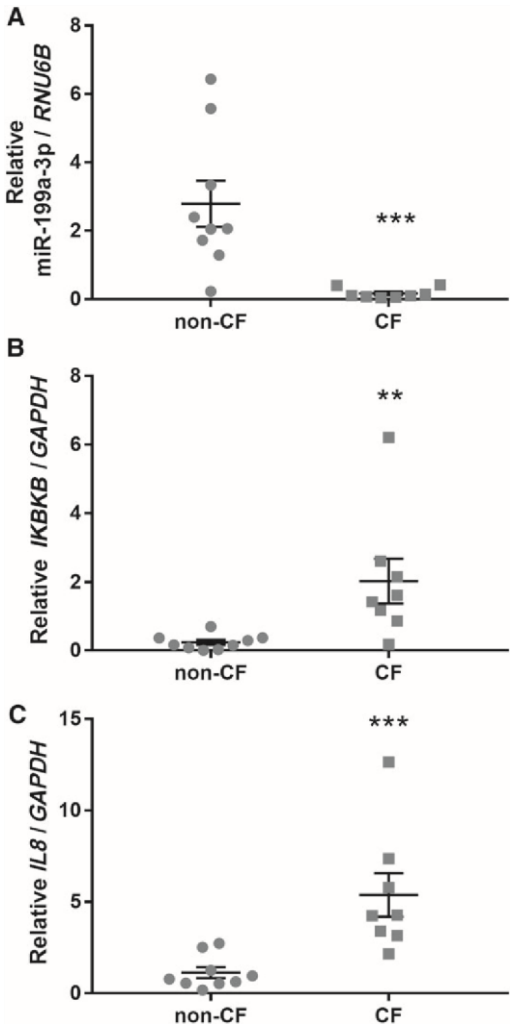


Figure 2. Expression of (A) miR-199a-3p, (B) *IKBKB*, and (C) *IL8* in CF (n= 8) and non-CF (n= 9) bronchial tissues. The results were standardized by the expression of endogenous controls *RNU6B* for miRNA and *GAPDH* for *IKBKB* and *IL8*. The Mann–Whitney *U*-test was used to determine significance (p= 0.0003, p = 0.001, and p = 0.0003, respectively).

concentrations (2.5, 10, 30, 50, or 100nM; supplementary material, Figure S3) or with scramble mimic as the control for different durations (24, 48, or 72h; supplementary material, Figure S4). miR-199a-3p expression was analysed by RT-qPCR. The level of miR-199a-3p in the presence of 30nM of the mimic for 48h increased by a factor of 300 compared with that in the control. As this represented the optimal conditions, subsequent experiments were performed under these conditions. Next, to test whether miR-199a-3p inhibits *IKBKB* expression by binding to its 3′-UTR, CFBE cells were co-transfected with a luciferase reporter vector containing the 3′-UTR region of wild-type *IKBKB* (WT-IKBKB-3′UTR) or with the 3′-UTR region of mutated *IKBKB* (M-IKBKB-3′UTR) and with miR-199a-3p mimic or scramble mimic as the control. At 48h, transfection with the mimic induced stronger miR-199a-3p expression than that in the control (Figure 3A). We observed a significant

Table 2. Pearson correlation matrix for miR-199a-3p, *IKBKB*, and *IL8* expression levels in (A) non-CF controls (*n*= 9) and (B) CF patients (*n*= 8)

A		
P values/non–CF pathology group		
Variables	*IL8*	*IKBKB*
miR-199a-3p	0.001	0.002
IKBKB	< 0.0001	
B		
P values/CF pathology group		
Variables	*IL8*	*IKBKB*
miR-199a-3p	0.115	0.005
IKBKB	0.151	

The values in bold are significantly different from 0 at an alpha of 0.05.

decrease in luciferase activity after the co-transfection of miR-199a-3p mimic/WT-IKBKB-3′UTR compared with miR-199a-3p mimic/M-IKBKB-3′UTR, and this decrease is more important compared with that of mimic control/WT-IKBKB-3′UTR (Figure 3B). This indicates a direct miR-199a-3p/*IKBKB* interaction at the 3′-UTR region of *IKBKB*.

miR-199a-3p regulates the NF-κB pathway through *IKBKB*

Under the same conditions as described above, we assayed various proteins implicated in the NF-κB pathway (IKKβ, phospho-IκBα, NF-κB, and IL-8). In the presence of miR-199a-3p mimic in CFBE cells, we observed that IKKβ protein expression was lower by 40% than in CFBE cells transfected with scramble mimic (Figure 4A). Similar results were obtained with other validated miR-199a-3p targets at the transcript level (supplementary material, Figure S5). There also appeared to be a trend for reduced expression (by 14%) of phospho-IκBα in the presence of miR-199a-3p mimic (Figure 4B). Moreover, we observed a 36% decrease of NF-κB protein expression in CFBE cells transfected with miR-199a-3p mimic compared with the control (Figure 4C).

Next, we evaluated the effect of miR-199a-3p on NF-κB activation in the nucleus using the TransAM method. From CFBE cells transfected with miR-199a-3p mimic or control, we extracted nuclear proteins 48h after transfection. NF-κB activity was measured from these protein extracts through a colorimetric reaction, with the absorbance being proportional to NF-κB activity. We observed that NF-κB activity was significantly lower in CFBE cells transfected with miR-199a-3p mimic [0.2 arbitrary unit (AU)] than that in the control condition (0.6 AU; Figure 4D). Finally, we assayed IL-8 secretion in CFBE supernatants 48h after transfection with miR-199a-3p mimic or the control by ELISA. We observed significantly lower IL-8 secretion by cells transfected with miR-199a-3p mimic (2446pg/ml) than that in the control condition (3367pg/ml; Figure 4E). In contrast, no significant difference in *IL8* mRNA was observed (data not shown).

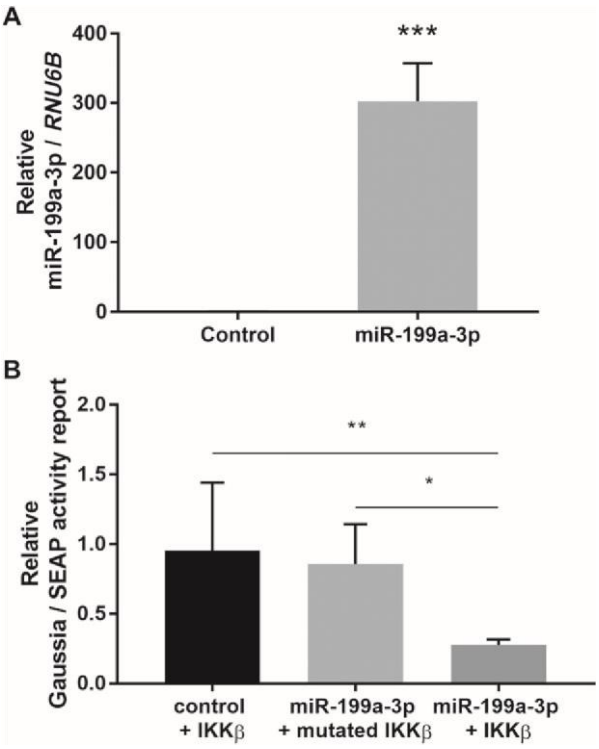


Figure 3. miR-199a-3p directly regulates IKKβ. (A) Expression of miR-199a-3p measured by RT-qPCR (p = 0.0002) in CFBE cells 48 h after transfection with miR-199a-3p mimic or scramble mimic as the control (30 nM; n= 8). (B) Modulation of IKKβ luciferase activity by miR-199a-3p in CFBE cells 48 h after co-transfection of the WT-IKBKB-3′UTR plasmid or M-IKKβ-3′UTR plasmid and miR-199a-3p mimic or scramble mimic as the control (30 nM; n= 4; p = 0.0089 and 0.0251). Student's *t*-test was used to determine significance.

Expression of miR-199a-3p in CF and non-CF plasma

To verify the association between inflammation and miR-199a-3p expression in the plasma of CF patients, we used RT-qPCR to measure the levels of this miRNA in non-CF and CF patient plasma extracts. We found no significant difference in the expression of miR-199a-3p between the plasma of CF and non-CF controls (Figure 5).

Discussion

For the first time, all dysregulated miRNAs and mRNAs were analysed in the same sample of primary CF bronchial epithelial cells cultured at an air–liquid interface and compared with levels in non-CF cultures, providing a non-biased approach. In this model, we found few dysregulated miRNAs and RNAs between the primary cells of CF patients and non-CF controls. Interestingly, half of the dysregulated genes were predicted to be associated with the NF-κB pathway, and one miRNA was significantly downregulated in CF patients: miR-199a-3p. Bioinformatics approaches predicted that this miRNA regulates the NF-κB pathway via an interaction with IKKβ. We thus focused our study

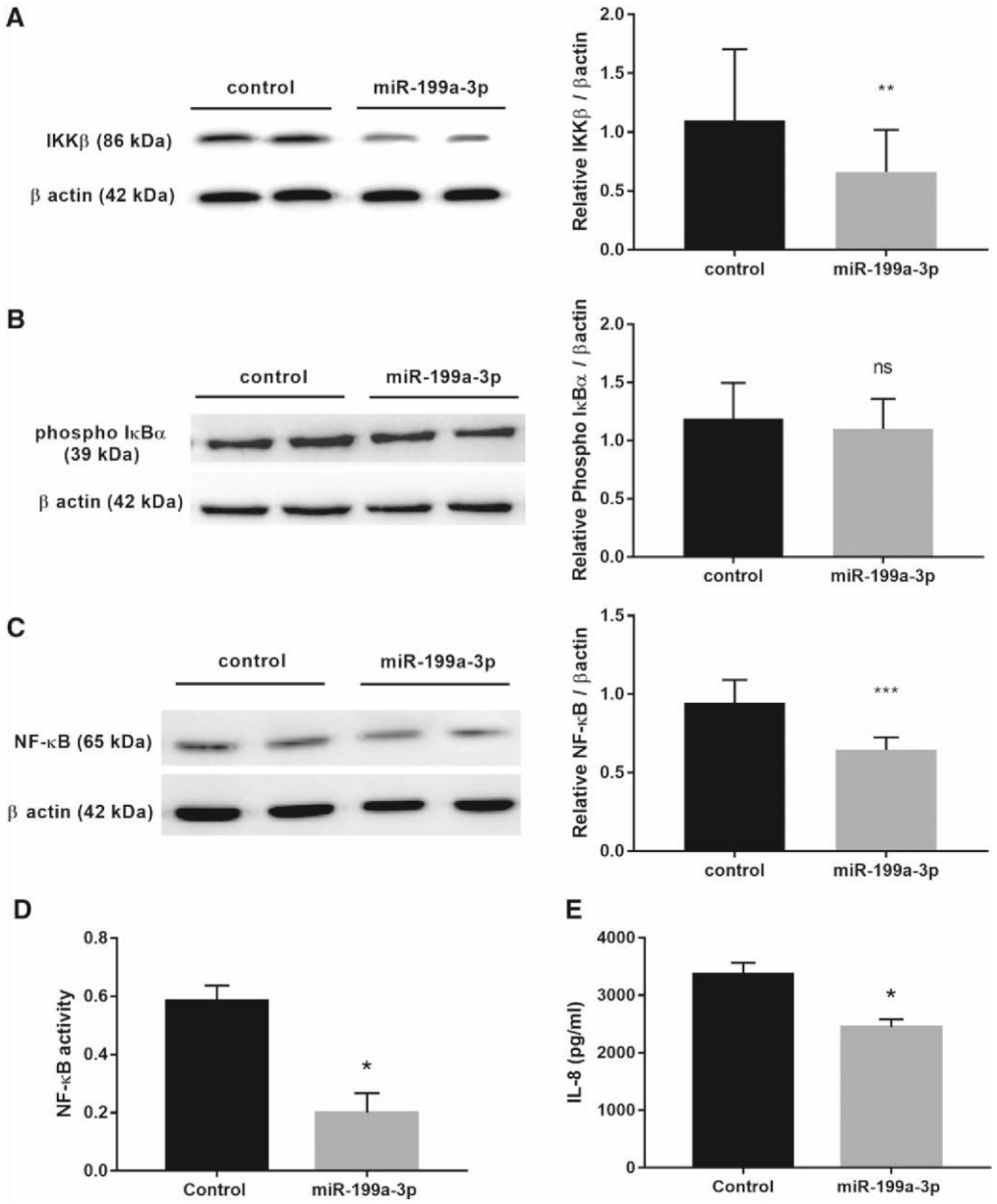


Figure 4. miR-199a-3p regulates the NF-κB pathway through IKKβ. Representative western blot of protein expression and quantification of (A) IKKβ (86 kDa; n= 8; p = 0.0166), (B) phospho IκBα (39 kDa; n= 5; ns = not significant), and (C) NF-κB (65 kDa) normalized to β-actin (42 kDa; n= 8; p = 0.0006). (D) NF-κB activity (n= 5; p = 0.011) and (E) assay of IL-8 secretion (n= 6; p = 0.017) in CFBE cells 48 h after transfection of miR-199a-3p mimic or scramble mimic as the control (30 nM). Student's t-test was used to determine significance.

on miR-199a-3p, and through functional analysis, we confirmed that miR-199a-3p specifically binds directly to the 3′-UTR of *IKBKB* in the CF pulmonary context. Furthermore, we demonstrated that the upregulated expression of miR-199a-3p leads to decreases in the activation of NF-κB and the secretion of IL-8, the main pro-inflammatory parameter dysregulated in CF airways.

Chen *et al* [27] demonstrated a functional role for miR-199a-3p in epithelial ovarian cancer cells as a direct inhibitor of IKKβ (*IKBKB*) expression, leading to modulationoftheNF-κBpathway. Dai *et al* [18] found similar results in endometrial stromal cells, showing through *in vitro* and *in vivo* experiments that NF-κB inhibition through miR-199a-3p transfection could abrogate the development and maintenance of endometriosis, partly by reducing pro-inflammatory and invasion mediators. Our results validate the presence of this regulatory system in lung tissue and provide new insights into the origin of the constitutive inflammation observed in CF patients. If the targets of certain miRNAs are tissue-specific, miR-199a-3p can regulate different types of cells by down regulating different target genes [28,29]. However, the regulation of the NF-κB signalling pathway by miR-199a-3p via direct interaction with *IKBKB* appears to be applicable to different cell types (epithelial ovarian cancer cells, endometrial stromal cells, and CF cells) in different pathological contexts, including those involving tissue repair, chemoresistance, tumour progression, and pro-inflammatory environments.

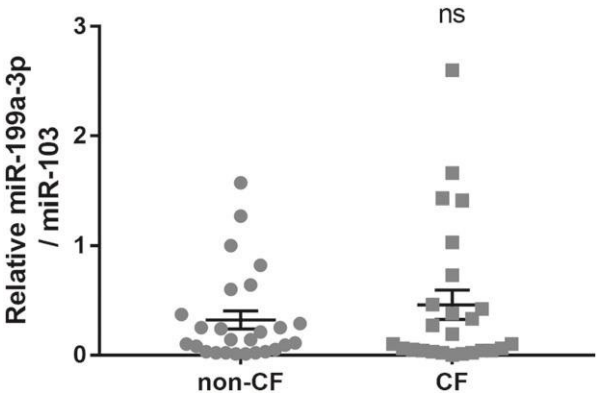


Figure 5. Expression of miR-199a-3p in CF patient and non-CF control plasma. Expression of miR-199a-3p in the plasma of CF patients (*n*= 25) and non-CF controls (*n*= 26). The results were standardized by the endogenous plasma control miR-103. Student's *t*-test was used to determine levels of significance.

In the absence of inducible inflammation, our results indicate that the NF-κB pathway is constitutively activated in CF cells, leading to the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-8, in contrast to the results obtained by Becker *et al* [30]. Moreover, we demonstrated that different miRNAs are dysregulated, and miR-199a-3p can control the NF-κB pathway through IKKβ. Other groups have performed miRNA expression profiling studies and have identified other altered miRNA expression patterns [31,32]. The differences might be explained by the model and/or the method used. For example, Oglesby *et al* [31] observed an increase in miR-199a-3p, but CF bronchial brush sampling might be prone to bacterial infection, confirming the evidence for important roles for miRNAs in regulating innate immunity. For the first time, in the context of CF, we demonstrated a new mechanism of inflammation regulation.

To our knowledge, this is the first observation of a possible link between miR-199a-3p expression and IL-8 secretion in bronchial epithelial resting cells. This result provides novel clues about IL-8 expression and NF-κB activation in the context of CF, and highlighting the role of miRNA in this regulation.

The deregulation of inflammatory processes has been shown to pass through the NF-κB and MAPK signalling pathways, notably via p38 and ERK1/2, which are constitutively active in the CF context [33]. However, the causes of the infection/inflammation cycles that degrade the pulmonary epithelium remain unknown. Previous studies in our laboratory showed that mutations in the *CFTR* gene led to chloride dysfunction, resulting in the deregulation of cellular homeostasis and an increase in the intracellular calcium concentration at the beginning of NF-κB hyperactivation [11,34,35]. Nevertheless, there is no direct link between calcium flow variation and NF-κB pathway activation in the literature. According to our results, miR-199a-3p regulates the activation of the NF-κB pathway by targeting the 3′-UTR of *IKBKB*, but the origin of the miR-199a-3p deregulation in CF remains to be identified. Therefore, we analysed the level of pre-miR-199a-1 and pre-miR-199a-2 as a precursor of miR-199a (data not shown), and the level of miR-199a-5p, the other form of miR-199a. We did not observe any significant difference in the pre-miRNAs, but we found a significant increase in miR-199a-5p in CF cells (data not shown), as previously demonstrated [36]. We can hypothesise that a post-maturation mechanism could regulate the expression of miR-199a-3p. Even if we cannot prove and establish this, for the time being, miR-199a-3p could be an intermediary actor between calcium and the NF-κB pathway. Sun *et al* demonstrated that miR-199a-3p expression is dependent on calcium [37]. Interactions between miRNAs and calcium are prevalent in the literature and play fundamental roles in many pathologies [38–40], notably in the cellular processes of proliferation, adhesion, differentiation, and inflammation. For example, miRNAs are known to act on genes such as *SERCA*, *IP3R*, and *RYR*, which are genes that encode calcium carriers located on the endoplasmic reticulum [39]. Thus, one hypothesis is that miR-199a-3p is regulated by calcium in CF. The second hypothesis is that miR-199a-3p is regulated by a pre-existing pro-inflammatory environment. The level of miR-199a-3p is decreased in CF cells, leading to increases in the activation of the NF-κB pathway and secretion of IL-8, and this cytokine may act to regulate the expression of miR-199a-3p through a feedback cycle. Further investigations are needed to understand the origin of miR-199a-3p dysregulation in the context of CF.

Based on the IKKβ luminescence assay, the significant decrease (70%) in IKKβ observed in the presence of miR-199a-3p mimic explains the reduction in IL-8 secretion. These relatively low decreases in IL-8 secretion can be explained by the fact that protein translation is under the regulation of other miRNAs and not only miR-199a-3p. Sonneville *et al* [22] reported that more than 49 000 proteins (representing half of all proteins expressed in human cells) are predicted to be regulated by the miRNAs that regulate *CFTR*, and one miRNA can target multiple mRNAs, highlighting the complexity of this regulatory system [41]. Thus, other miRNAs are likely to act on numerous targets in the NF-κB signalling pathway [42,43], such as miR-9-5p [44], which has been shown to directly target the 3′-UTR of *RELA* encoding the NF-κB p65 subunit [45] and whose expression increases when NF-κB/MyD88 is activated [46]. Moreover, compensatory phenomena targeting other proteins in this pathway could modulate the regulation of inflammation. Downstream of the NF-κB pathway, miR-9-5p3 is controlled by the minichromosome maintenance complex component 7 (*MCM7*) gene, which can bind the 3′-UTR of *IL8*, thereby decreasing *IL8* mRNA levels and IL-8 secretion [47]. During *Pseudomonas aeruginosa* infection, miR-9-5p3 downregulation has been shown to directly lead to the stabilization of *IL8* mRNA. In CF, NF-κB has been indicated to not be the only transcription factor involved in the regulation of IL-8 secretion; in fact, one study has shown that the MAPK pathway is also implicated in the deregulation of this process, and this

activation could compensate the observed decrease in NF-κB activation [33,48,49].

In the future, the role of miR-199a-3p in processes such as apoptosis, proliferation, and differentiation should be determined in the context of CF, as well as its involvement in muscular dystrophy and oesophageal cancer [19,50]. This will allow for the further elucidation of its function in the regulation of cellular processes that involve the MAPK and Wnt pathways. Moreover, the therapeutic use of miR-199a-3p might prevent the chemo-attraction of neutrophils and thus limit the tissue degradation induced by these cells at the pulmonary level. We have demonstrated that miR-199a-3p as a plasma biomarker in the monitoring of pulmonary inflammation in CF patients is not sufficient to improve patient management of inflammatory processes; therefore, more studies are needed to propose specific serum miRNA expression profiles in CF. Nevertheless, this study represents a new breakthrough in our understanding of the regulation of chronic inflammation occurring in CF and highlights the importance of dysregulated miRNAs in this regulation.

Acknowledgements

We thank Dr DC Gruenert, who provided the 16HBE14o$^-$ and CFBE41o$^-$ cells. This research was funded in part by grants from Inserm, UPMC Univ Paris 06, the non-profit organization Vaincre la Mucoviscidose, and the Legs Poix-Chancellerie des Universités, Paris. PB received a PhD grant from Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06. FS received a PhD grant from Vaincre la Mucoviscidose and a post-doctoral grant from SATT Lutech.

Author contributions statement

PB performed and designed the experiments, interpreted results, and wrote the manuscript. MDE and FS performed and designed some experiments and interpreted some results. NR and PLR performed some experiments. SBL provided human explants from patients. HC interpreted some results. OT performed and designed experiments, interpreted results, obtained funding, and wrote the manuscript.

References

1. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet* 2009; **373:** 1891–1904.

2. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; **245:** 1066–1073 [published erratum appears in *Science* 1989; **245**: 1437].

3. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, *et al.* Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 1991; **253:** 202–205.

4. Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: from molecular understandingto clinical application. *Nat Rev Genet* 2015; **16:** 45–56.

5. Boucher RC. An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lungdisease. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; **54:** 1359–1371.

6. Tabary O, Zahm JM, Hinnrasky J, *et al.* Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells *in vivo* and *in vitro*. *Am J Pathol* 1998; **153:** 921–930.

7. Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiencysyndrome. *Nat Med* 2012; **18:** 509–519.

8. Jacquot J, Tabary O, Le Rouzic P, *et al.* Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; **40:** 1703–1715.

9. Tirouvanziam R, de Bentzmann S, Hubeau C, *et al.* Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; **23:** 121–127.

10. Karin M. The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) andNF-kappaB activation. *J Biol Chem* 1999; **274:** 27339–27342.

11. Tabary O, Boncoeur E, de Martin R, *et al.* Calcium-dependent regulation of NF-(kappa)B activation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell Signal* 2006; **18:** 652–660.

12. Jacquot J, Tabary O, Clement A. Hyperinflammation in airways ofcystic fibrosis patients: what's new? *Expert Rev Mol Diagn* 2008; **8:** 359–363.

13. Arora H, Qureshi R, Jin S, *et al.* miR-9-5p and let-7 g enhance the sensitivity to ionizing radiation by suppression of NFkappaB1. *Exp Mol Med* 2011; **43:** 298–304.

14. PoosK,SmidaJ,NathrathM,*et al.*HowmicroRNAandtranscription factor co-regulatory networks affect osteosarcoma cell proliferation. *PLoS Comput Biol* 2013; **9:** e1003210.

15. Yang Y, Wang J-K. The functional analysis of microRNAs involvedin NF-κB signaling. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; **20:** 1764–1774.

16. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms ofpost-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; **9:** 102–114.

17. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; **19:** 92–105.

18. Dai L, Gu L, Di W. MiR-199a attenuates endometrial stromal cellinvasiveness through suppression of the IKKbeta/NF-kappaB pathway and reduced interleukin-8 expression. *Mol Hum Reprod* 2012; **18:** 136–145.

19. Byrnes KA, Phatak P, Mansour D, *et al.* Overexpression of miR-199a-5p decreases esophageal cancer cell proliferation through repression of mitogen-activated protein kinase kinase kinase-11 (MAP3K11). *Oncotarget* 2016; **7:** 8756–8770.

20. Foster PS, Plank M, Collison A, *et al.* The emerging role of microRNAs in regulating immune and inflammatory responses in the lung. *Immunol Rev* 2013; **253:** 198–215.

21. Ramachandran S, Karp PH, Osterhaus SR, *et al.* Post-transcriptional regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and function by microRNAs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; **49:** 544–551.

22. Sonneville F, Ruffin M, Guillot L, *et al.* New insights about miRNAs in cystic fibrosis. *Am J Pathol* 2015; **185:** 897–908.

23. Wiszniewski L, Jornot L, Dudez T, *et al.* Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; **34:** 39–48.

24. Balloy V, Varet H, Dillies MA, *et al.* Normal and cystic fibrosis human bronchial epithelial cells infected with *Pseudomonas*

aeruginosa exhibit distinct gene activation patterns. *PLoS One* 2015; **10:** e0140979.

25. Pandit KV, Corcoran D, Yousef H, *et al.* Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; **182:** 220–229.

26. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation byacid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; **162:** 156–159.

27. Chen R, Alvero AB, Silasi DA, *et al.* Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells. *Oncogene* 2008; **27:** 4712–4723.

28. Dahiya N, Sherman-Baust CA, Wang TL, *et al.* MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. *PLoS One* 2008; **3:** e2436.

29. Inomata M, Tagawa H, Guo YM, *et al.* MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood* 2009; **113:** 396–402.

30. Becker MN, Sauer MS, Muhlebach MS, *et al.* Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; **169:** 645–653.

31. Oglesby IK, Bray IM, Chotirmall SH, *et al.* miR-126 is downregulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression. *J Immunol* 2010; **184:** 1702–1709.

32. Ramachandran S, Karp PH, Jiang P, *et al.* A microRNA network regulatesexpressionandbiosynthesisofwild-typeandΔF508mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109:** 13362–13367.

33. Muselet-Charlier C, Roque T, Boncoeur E, *et al.* Enhanced IL-1beta-induced IL-8 production in cystic fibrosis lung epithelial cells is dependent of both mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **357:** 402–407.

34. Ribeiro CM. The role of intracellular calcium signals in inflammatoryresponses of polarised cystic fibrosis human airway epithelia. *Drugs R D* 2006; **7:** 17–31.

35. Antigny F, Norez C, Becq F, *et al.* CFTR and Ca signaling in cystic fibrosis. *Front Pharmacol* 2011; **2:** 67.

36. Zhang PX, Cheng J, Zou S, *et al.* Pharmacological modulation of the AKT/microRNA-199a-5p/CAV1 pathway ameliorates cystic fibrosis lung hyper-inflammation. *Nat Commun* 2015; **6:** 6221.

37. Sun X, Ruan YC, Guo J, *et al.* Regulation of miR-101/miR-199a-3p by the epithelial sodium channel during embryo implantation: involvement of CREB phosphorylation. *Reproduction* 2014; **148:** 559–568.

38. Magenta A, Dellambra E, Ciarapica R, *et al.* Oxidative stress, microRNAs and cytosolic calcium homeostasis. *Cell Calcium* 2016; **60:** 207–217.

39. Finger F, Hoppe T. MicroRNAs meet calcium: joint venture in ERproteostasis. *Sci Signal* 2014; **7:** re11.

40. Harada M, Luo X, Murohara T, *et al.* MicroRNA regulation and cardiac calcium signaling: role in cardiac disease and therapeutic potential. *Circ Res* 2014; **114:** 689–705.

41. Teta M, Choi YS, Okegbe T, *et al.* Inducible deletion of epidermal Dicer and Drosha reveals multiple functions for miRNAs in postnatal skin. *Development* 2012; **139:** 1405–1416.

42. Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, *et al.* MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J Mol Cell Biol* 2011; **3:** 159–166.

43. Lu S, Liu H, Farley JM Sr. Macrolide antibiotics inhibit mucus secretion and calcium entry in swine airway submucosal mucous gland cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; **336:** 178–187.

44. Wang LQ, Kwong YL, Kho CS, *et al.* Epigenetic inactivation of miR-9-5p family microRNAs in chronic lymphocytic leukemia – implications on constitutive activation of NFkappaB pathway. *Mol Cancer* 2013; **12:** 173.

45. Guo LM, Pu Y, Han Z, *et al.* MicroRNA-9 inhibits ovarian cancer cell growth through regulation of NF-kappaB1. *FEBS J* 2009; **276:** 5537–5546.

46. Liu GD, Zhang H, Wang L, *et al.* Molecular hydrogen regulates the expression of miR-9-5p, miR-21 and miR-199 in LPS-activated retinal microglia cells. *Int J Ophthalmol* 2013; **6:** 280–285.

47. Fabbri E, Borgatti M, Montagner G, *et al.* Expression of miR-9-5p3 and interleukin-8during*Pseudomonasaeruginosa*-mediatedinductionof pro-inflammatory responses. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; **50:** 1144–1155.

48. Dosunmu EF, Emeh RO, Dixit S, *et al.* The anti-microbial peptide TP359 attenuates inflammation in human lung cells infected with *Pseudomonas aeruginosa* via TLR5 and MAPK pathways. *PLoS One* 2017; **12:** e0176640.

49. Dong ZW, Chen J, Ruan YC, *et al.* CFTR-regulated MAPK/NF-kappaB signaling in pulmonary inflammation in thermal inhalation injury. *Sci Rep* 2015; **5:** 15946.

50. Alexander MS, Kawahara G, Motohashi N, *et al.* MicroRNA-199a is induced in dystrophic muscle and affects WNT signaling, cell proliferation, and myogenic differentiation. *Cell Death Differ* 2013; **20:** 1194–1208.

51. Pan X, Jiang B, Liu J, *et al.* STC1 promotes cell apoptosis via NF-kappaB phospho-P65 Ser536 in cervical cancer cells. *Oncotarget* 2017; **8:** 46249–46261.

52. Wang R, Zhang M, Zhou W, *et al.* NF-kappaB signaling inhibits ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 gene expression. *J Neurochem* 2011; **116:** 1160–1170.

53. Wang T, He X, Liu X, *et al.* Weighted gene co-expression network analysis identifies FKBP11 as a key regulator in acute aortic dissection through a NF-κB dependent pathway. *Front Physiol* 2017; **8:** 1010.

54. Puliyappadamba VT, Hatanpaa KJ, Chakraborty S, *et al.* The role of NF-kappaB in the pathogenesis of glioma. *Mol Cell Oncol* 2014; **1:** e963478.

55. House CD, Jordan E, Hernandez L, *et al.* NFκB promotes ovarian tumorigenesis via classical pathways that support proliferative cancer cells and alternative pathways that support $ALDH^+$ cancer stem-like cells. *Cancer Res* 2017; **77:** 6927–6940.

56. Iwanaszko M, Brasier AR,Kimmel M.Thedependenceof expressionofNF-kappaB-dependentgenes:statisticsandevolutionaryconservation of control sequences in the promoter and in the 3' UTR. *BMC Genomics* 2012; **13:** 182.

57. Barbu EA, Zhang J, Berenstein EH, *et al.* The transcription factor *Zeb2* regulates signaling in mast cells. *J Immunol* 2012; **188:** 6278–6286.

58. Chesi M, Bergsagel PL. Advances in the pathogenesis and diagnosis of multiple myeloma. *Int J Lab Hematol* 2015; **37**(suppl 1): 108–114.

59. Bredholt G, Mannelqvist M, Stefansson IM, *et al.* Tumor necrosis is an important hallmark of aggressive endometrial cancer and associates with hypoxia, angiogenesis and inflammation responses. *Oncotarget* 2015; **6:** 39676–39691.

60. Xiang N, He M, Ishaq M, *et al.* The DEAD-Box RNA helicase DDX3 interacts with NF-kappaB subunit p65 and suppresses p65-mediated transcription. *PLoS One* 2016; **11:** e0164471.

61. Zong M, Wu XG, Chan CW, *et al.* The adaptor function of TRAPPC2 in mammalian TRAPPs explains TRAPPC2-associated SEDT and TRAPPC9-associated congenital intellectual disability. *PLoS One* 2011; **6:** e23350.

SUPPLEMENTARY MATERIAL ONLINE

Supplementary figure legends

Figure S1. Luciferase plasmid construction with the seed sequence of the *IKBK* 3′-UTR

Figure S2. Expression of miR-23a in CF (n = 4) and non-CF (n = 4) bronchial tissues

Figure S3. miR-199a-3p transfection concentration determination

Figure S4. Determination of the time for transfection

Figure S5. Expression of *MTOR* and *ZHX1* in CFBE after transfection with scramble mimic (control) or miR-199a-3p mimic (n = 6; p = 0.0304 and 0.021)

25 Years ago in *The Journal of Pathology…*

Ultimobranchial body nests in human fetal thyroid: An autopsy, histological, and immunohistochemical study in relation to solid cell nests and mucoepidermoid carcinoma of the thyroid

Dr. H. R. Harach, G. M. Vujanić, B. Jasani

Immunolocalization of heparinbinding growth factors (HBGF) types 1 and 2 in rat liver. Selective hyperexpression of HBGF-2 in carbon tetrachloride-induced fibrosis

Frederic Charlotte, Khin Maung Win, Anne-Marie Preaux, Philippe Mavier, Daniel Dhumeaux, Elie Serge Zafrani, Jean Rosenbaum

Retinoblastoma (rb) gene product expression in lymphomas. Correlation with Ki67 growth fraction

Dr. Juan C. Martínez, Miguel A. Piris, Margarita Sánchez-Beato, Raquel Villuendas, Juan L Orradre, Patricia Algara, Lidia Sánchez-Verde, Pedro Martínez

Molecular mechanisms involved in intraepithelial lymphocyte migration: A comparative study in skin and tonsil

Stefania Uccini MD., Luigi P. Ruco, Francesca Monardo, Ilaria Lesnoni La Parola, Decio Cerimele, Carlo D. Baroni

To view these articles, and more, please visit:
www.thejournalofpathology.com

Click 'BROWSE' and select 'All issues', to read articles going right back to Volume 1, Issue 1 published in 1892.

The Journal of Pathology
Understanding Disease

A Journal of
The Pathological Society

5. Résultats complémentaires

Des données supplémentaires à l'article sont aussi disponibles en ligne et ont été regroupées dans la figure 35.

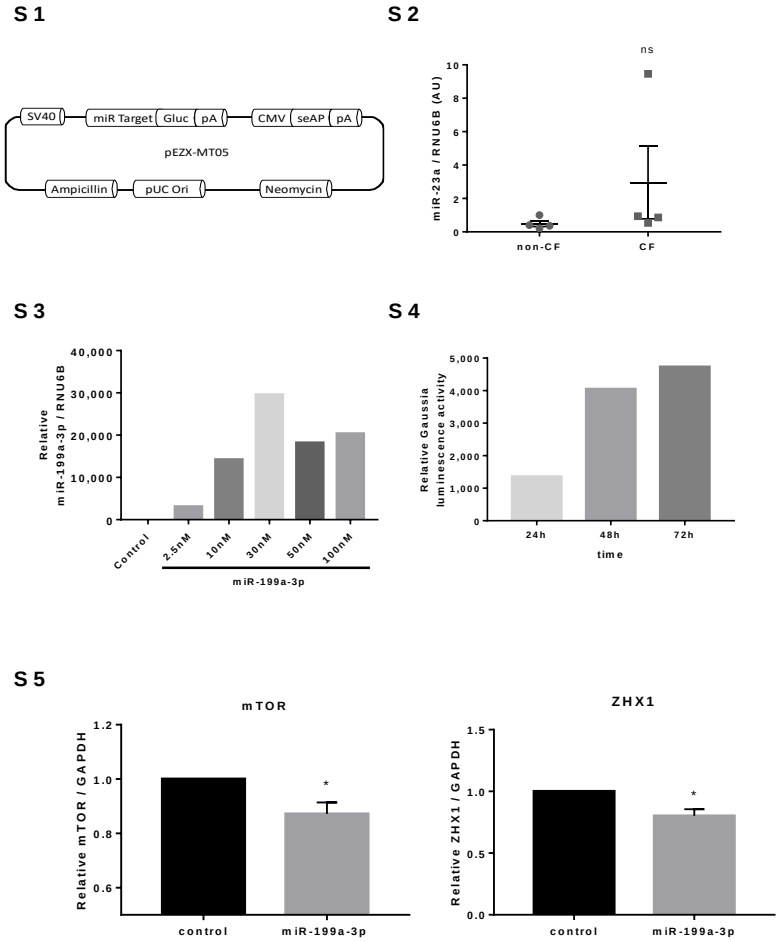


Figure 35 : Résultats complémentaires de l'article sur miR-199a-3p.

S1: Luciferase plasmid construction with the seed sequence of the IKBK 3′-UTR. SV40 and CMV: promoters; pUC Ori: origin of bacterial replication for the cloning of the plasmid; ampicillin and neomycin: plasmid selection antibiotics; Gluc-miR target: luciferase reporter gene coupled to the target microRNA target sequence (Gaussia); seAP: alkaline phosphatase gene (endogenous control).

S2: Expression of miR-23a in CF (n = 4) and non-CF (n = 4) bronchial tissues. The results are standardized by the expression of the endogenous control RNU6Bfor miRNA. The Mann–Whitney U-test was used to determine significance.

S3: miR-199a-3p transfection concentration determination. Expression of miR-199a-3p after transfection of scramble mimic as the control or miR-199a-3p mimic at concentrations of 2.5, 10, 30, 50, or 100 nm in CFBE cells.

S4: Determination of the time for transfection. Kinetics of chemiluminescent activity of Gaussia and SEAP proteins at 24, 48, and 72 h after transfection of the WT-IKBKB-3′UTR plasmid in CFBE.

S5: Expression of MTOR and ZHX1 in CFBE after transfection with scramble mimic (control) or miR-199a-3p mimic (n = 6; p = 0.0304 and 0.021).

6. Résultats de révision de l'article

Pour la publication de cet article, des modifications ont dû être apportées et des nouvelles quantifications effectuées :

1. Les cellules 16HBE14o- et CFBE41o- n'étant pas isogéniques, cette figure représentant la quantification de l'expression de miR-199a-3p entre ces deux types cellulaires, initialement présente dans les données supplémentaires, a été retirée (figure 36).

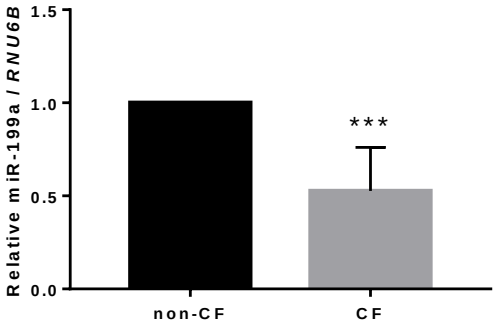


Figure 36 : Comparaison de l'expression de miR-199a-3p entre des cellules non-CF et CF en conditions basales. Un test t de *Student* a été utilisé pour déterminer la significativité (p=0.0006).

2. Pour valider les résultats du *small RNAseq*, nous avons sélectionné de manière aléatoire deux miARN : miR-9-5p et miR-23a (figure 37) dont l'expression ne variait pas entre les cellules épithéliales bronchiques issues des patients CF par rapport aux sujets sains (non-CF) et nous avons mesuré leurs expressions. Seule la figure 37 B a été incluse dans l'article en données supplémentaires.

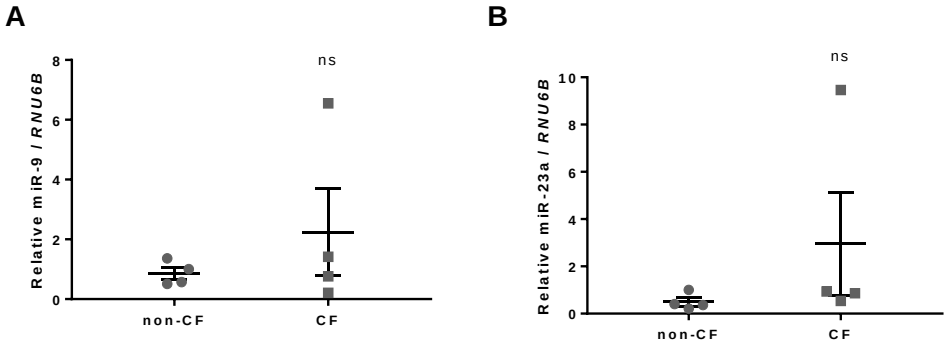


Figure 37 : Validation de l'expression de deux miARN dont l'expression ne varie pas dans le *small RNAseq*. Mesure de l'expression de miR-9-5p et miR-23a dans les cellules épithéliales humaines issues de patients CF et non-CF cultivées en interface air-liquide (n=4). Un test U de *Mann-Whitney* a été utilisé pour déterminer la significativité (A, p=0.6857 ; B, p=0.2).

3. Les données concernant la mesure de l'activité luciférase du plasmide contenant la région 3'-UTR d'*IKBKB* WT suite à la co-transfection avec un mimic de miR-199a-3p ou un mimic contrôle ont été complétées avec un plasmide 3'-UTR d'*IKBKB* muté au niveau de la région *seed*. La séquence originale est « UTR CGCCTTGTCTGCACACTGGAGGTCCTCCATT » et la séquence mutée est « UTR CGCCTTGTCTGCTGTACCAGGTCCTCCATT » (Dai et al., 2012). La figure a été intégrée en tant que figure 3B de l'article.

4. En plus de son action sur IKKβ, nous avons analysé les effets de miR-199a-3p sur l'expression de cinq gènes par RT-qPCR. En utilisant des bases de données de prédictions bio-informatique, nous avons sélectionné *CAV2*, *mTOR*, *DDX3X*, *CD44* et *ZHX1* prédites comme potentielles cibles de miR-199a-3p. La figure 38, nous montre que les expressions de *CAV2* et *CD44* ne varient pas, l'expression de *DDX3X* est augmentée significativement et les expressions de *mTOR* et *ZHX1* sont significativement diminuées dans des cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-) transfectées avec un mimic de miR-199a-3p par rapport au mimic contrôle pendant 48 h. Le miR-199a-3p est capable de réguler significativement IKKβ mais aussi de diminuer l'expression en ARNm de *mTOR* et *ZHX1*. Ces résultats ont été inclus dans les données supplémentaires (figure S5).

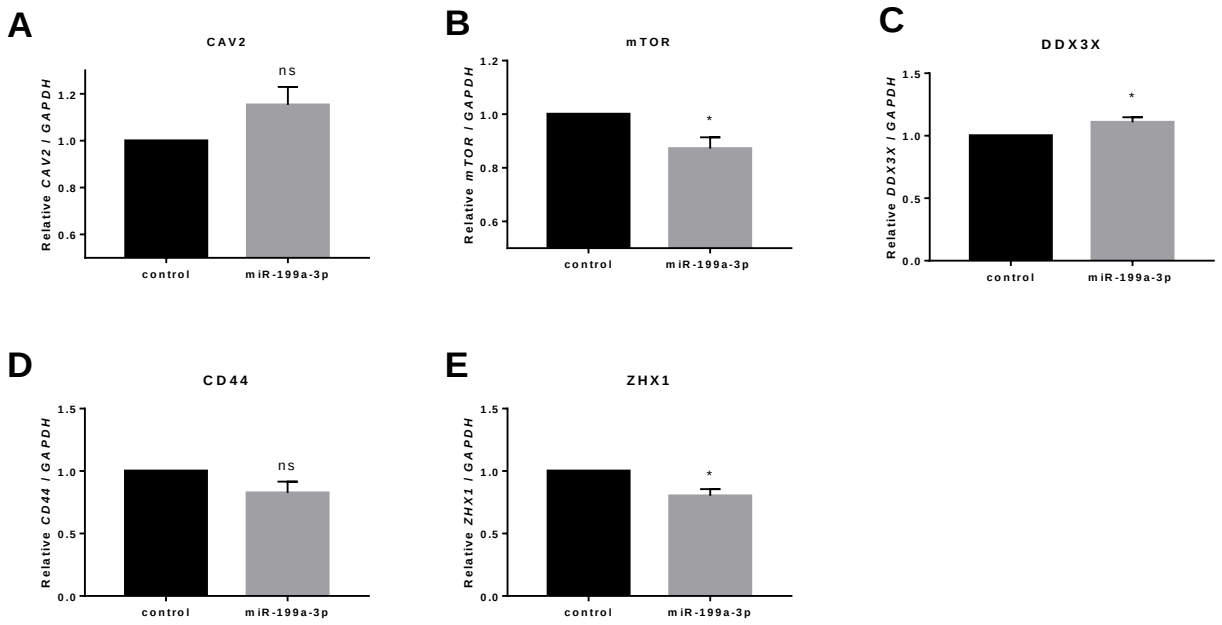


Figure 38 : Impact de la surexpression de miR-199a-3p sur d'autres cibles prédites. Expressions de *CAV2* (A, p=0.0970), *mTOR* (B, p=0.0304), *DDX3X* (C, p=0.0403), *CD44* (D, p=0.1240) et *ZHX1* (E, p=0.0210) mesurées dans des cellules CF (CFBE41o-) après la transfection d'un mimic de miR-199a-3p ou d'un mimic contrôle (n=6).

5. Nous avons mesuré l'expression en ARNm de l'*IL-8*, dans l'objectif de compléter les données concernant la sécrétion de cette cytokine dans des cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-) transfectées avec un mimic de miR-199a-3p ou un mimic contrôle pendant 48h. Nous n'avons observé aucune variation significative de l'expression en ARNm de l'*IL-8* (figure 39).

Cette expérience ayant été effectuée 48 h après la transfection, le délai est peut-être trop long pour observer une variation en ARNm. De plus, une étude a montré l'implication d'une autre voie de signalisation, MAPK, dans la régulation de l'expression de l'IL-8 (Muselet-Charlier et al., 2007a). L'inhibition de l'activation de la voie NF-κB par le miR-199a-3p, pourrait être compensée par l'activation de la voie des MAPK. Ce résultat n'a pas été inclus dans les figures de l'article ou aux données complémentaires mais cité dans le corps du texte.

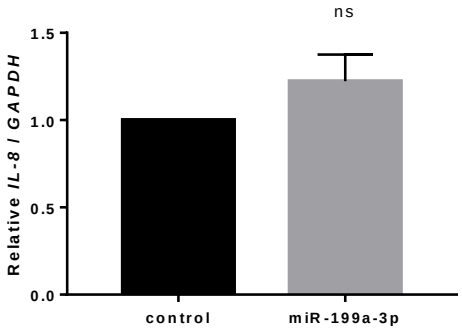


Figure 39 : Effet du miR-199a-3p sur l'expression en ARNm de l'*IL-8*. Expression de l'*IL-8* mesurée dans des cellules CF (CFBE41o-) après la transfection d'un mimic de miR-199a-3p ou d'un mimic contrôle pendant 48 h (n=6, p=0.3880).

6. Nous avons mesuré l'expression basale des deux gènes synthétisant le miR-199a-3p, à savoir le pre-miR-199a-1 et le pre-miR-199a-2 dans des cellules non-CF (16HBE14o-) et CF (CFBE41o-). Nous avons observé qu'il n'y a pas de différence significative de l'expression du pre-miR-199a-1 (figure 40, A) mais une tendance à la diminution non significative de l'expression du pre-miR-199a-2 (figure 40, B) dans les cellules CF par rapport aux non-CF. Nous avons aussi mesuré l'expression du miR-199a-5p par qPCR, qui est significativement augmentée dans les cellules épithéliales bronchiques CF par rapport aux cellules non-CF (figure 41). Ces résultats ne permettent pas d'expliquer l'origine de la dérégulation de l'expression de miR-199a-3p, qui pourrait être due à un autre mécanisme de régulation. Ces résultats ont été inclus dans le corps du texte en données non montrées.

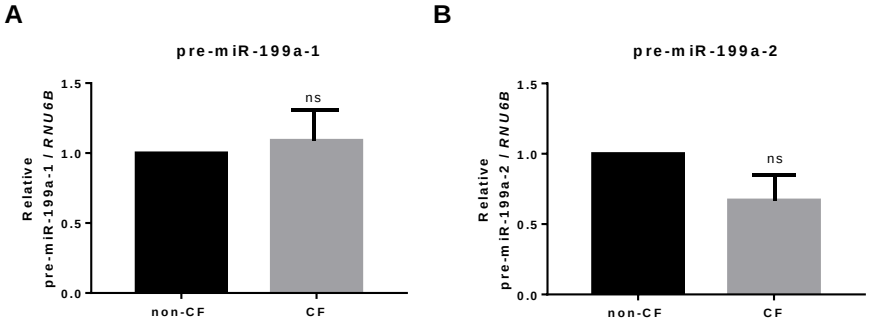


Figure 40 : Expression basale des gènes synthétisant le miR-199a-3p. Comparaison de l'expression de pre-miR-199a-1 et pre-miR-199a-2 en condition basale dans des cellules non-CF (16HBE14o-) et CF (CFBE41o-) (n=4, p > 0.9999 et 0.6857).

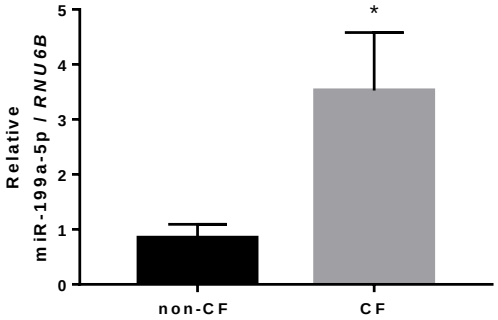


Figure 41 : Comparaison de l'expression basale de miR-199a-5p entre des cellules non-CF (16HBE14o-) et CF (CFBE41o-). Un test t de *Student* a été utilisé pour déterminer la significativité.

7. Pour déterminer l'effet d'une diminution de l'expression de miR-199a-3p sur l'expression protéique d'IKKβ, nous avons transfecté des cellules CF avec un antagomiR-199a-3p ou un antagomiR contrôle pendant 24 h. Nous avons observé qu'il semblerait y avoir une augmentation de l'intensité de l'expression protéique d'IKKβ suite à la diminution de l'expression de miR-199a-3p par rapport à la condition contrôle (figure 42).

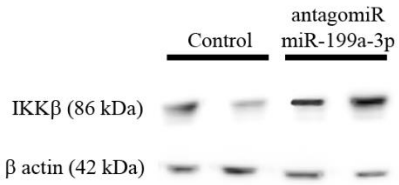


Figure 42 : Expression protéique d'IKKβ dans des cellules CF (CFBE41o-) après la transfection d'un antagomiR-199a-3p ou d'un antagomiR contrôle (30 nM) pendant 24 h.

II. Origine de la dérégulation de miR-199a-3p

Après avoir étudié l'impact d'une modulation de l'expression de miR-199a-3p sur l'inflammation chez les patients CF et montré qu'il pouvait réguler l'activation de la voie de signalisation NF-κB (Bardin et al., 2018a), nous voulions déterminer pourquoi ce miARN était dérégulé dans le contexte de la mucoviscidose. En effet, d'un point de vue fondamental, l'origine de la dérégulation de l'expression de miR-199a-3p reste inconnue. En nous basant sur la littérature et nos données, nous avons émis plusieurs hypothèses pouvant expliquer cette dérégulation. Elle pourrait être due au contexte pro-inflammatoire déjà présent, à la dysfonction intrinsèque de CFTR ou bien à des variations calciques intracellulaires. Bien que le *small RNAseq* ait été effectué sur des cellules épithéliales bronchiques issues de patients CF et de sujets sains non-CF en conditions basales, il nous semblait essentiel de vérifier quel pourrait être l'impact d'une infection bactérienne par *P. aeruginosa* sur l'expression de miR-199a-3p.

1. Matériels et méthodes

Afin de savoir pourquoi l'expression de miR-199a-3p est dérégulée dans le contexte CF et si elle est due à un contexte pro-inflammatoire préexistant, nous avons stimulé des cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-) avec de l'IL-1β (10 ng/mL) (200-01B, PeproTech, Neully-sur-Seine, France), du TNF-α (10 ng/mL) (300-1A, PeproTech) ou une combinaison des deux cytokines (1 ng/mL) pendant 6, 24 et 48 h. En effet, ces cytokines pro-inflammatoires sont retrouvées dans les expectorations des patients CF (Muhlebach and Noah, 2002; Nakamura et al., 1992; Osika et al., 1999; Suter et al., 1989). Les cellules ont été transfectées avec un mimic de miR-199a-3p ou un mimic contrôle pendant 24 h puis stimulées avec la combinaison IL-1β/ TNF-α (1 ng/mL) pendant encore 24 h. Une stimulation par la dexaméthasone (D1159, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) à différentes concentrations a aussi été effectuée pendant 6 h pour déterminer l'impact d'une stimulation anti-inflammatoire sur l'expression de miR-199a-3p.

Dans le but d'étudier la conductance Cl^- de CFTR, nous avons traité des cellules non-CF (16HBE14o-) avec l'inhibiteur 172 (Tocris, France) à une concentration finale de 10 µM pendant 24 h. L'utilisation d'un inhibiteur de CFTR sur des cellules non-CF permet d'inhiber l'activité du canal CFTR sans altérer sa structure, ni sa localisation au niveau de la membrane cellulaire.

Pour ré-adresser les protéines CFTR à la membrane plasmique et activer les efflux Cl^- nous avons traité des cellules CF (CFBE41o-) avec une combinaison de molécules de la société *Vertex pharmaceuticals* : Vx-809 et Vx-770 (S1565 et S1144, Selleckchem, Souffelweyersheim, France) formant la molécule Orkambi®, qui permettent respectivement de corriger l'adressage de CFTR à la membrane cellulaire et de potentialiser la conductance Cl^- de CFTR. Cette stimulation a été faite avec 1 µM de Vx-809 et 0,1 µM de Vx-770 pendant 24 h.

L'activité chlorure liée à CFTR a été mesurée en utilisant la technique du *premo halide sensor*. Les cellules sont transfectées avec une sonde fluorescente YFP modifiée sensible aux ions halogénures (YFP-H148Q/I152L) (ThermoFisher Scientific). Après 48 h de culture, la conductance chlorure de CFTR est stimulée avec de la forskoline + IBMX. Une solution d'ions I^- est ajoutée (14 mM) et la fluorescence est enregistrée sur le lecteur de plaque FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech).

Pour étudier l'influence de modulation de la concentration de calcium intracellulaire, nous avons stimulé des cellules non-CF (16HBE14o-) avec de la ionomycine (I3909, Sigma Aldrich) puis de la thapsigargine (T9033, Sigma-Aldrich), un activateur calcique induisant une augmentation stable de calcium dans la cellule, et en parallèle les mêmes expériences ont été effectuées sur des cellules CF (CFBE41o-) mais en utilisant cette fois du bapta-AM (B6769, Invitrogen, Paris, France), un chélateur calcique. Il n'y a pas de modification de la morphologie des cellules et la stimulation par de la thapsigargine/bapta augmente/diminue la $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$.

La modulation du flux calcique a été mesurée par l'intensité de Fluo-4 (F23917, Thermo Fisher) dans les cellules non-CF (16HBE14o-) stimulées avec la ionomycine ou la thapsigargine à différentes concentrations (10, 20, 40, 80 µM). Le Fluo-4 a été resuspendu dans du DMSO et mélangé à une solution de pluronic dans du milieu sans rouge phénol. Les cellules ont été incubées pendant 30 min à 37 °C avec ce milieu puis remplacé par un milieu sans Fluo-4. Une lecture a été faite pendant 180 sec avec une mesure toutes les 10 sec et la fluroresence est enregistrée sur le lecteur de plaque FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech).

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

Les expériences de RT-qPCR (TaqMan) ont été réalisées avec les sondes hsa-miR-199a-3p (0002304), hsa-pre-miR-199a-1 (Hs03302808_pri), hsa-pre-miR-199a-2 (Hs03302922_pri) et *RNU6B* (001093) comme contrôle endogène, *IL-8* (Hs174103) et *GAPDH* (Hs02786624_g1) comme contrôle endogène.

Les protéines nucléaires ont été extraites grâce au kit *Nuclear Extract* (Active Motif, Rixensart, Belgique), en suivant les instructions du fabricant. La concentration en protéines totales est évaluée avec un fluoromètre de type *Qubit* (Thermofisher). L'activation de la transcription du facteur nucléaire NF-κB (sous-unité p65) a ensuite été déterminée en utilisant le kit *TransAM™ Transcription Factor Assay* (Active Motif).
Les extraits nucléaires ont été déposés dans des puits au fond desquels se trouve fixé un oligonucléotide contenant la séquence consensus « κB », séquence de fixation de NF-κB. La liaison de NF-κB sur son site consensus est révélée par l'addition d'un anticorps primaire qui reconnaît spécifiquement un épitope de la sous-unité p65 de NF-κB. L'anticorps secondaire conjugué à l'HRP (*HorseRadish Peroxidase*) est ajouté et la réaction colorimétrique qui se produit est mesurée par spectrophotomètre à 450 nm. Les valeurs obtenues sont normalisées à la quantité totale de protéines nucléaires extraites pour chaque échantillon.

Les protéines totales ont été extraites grâce à un tampon de lyse contenant 1 volume de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 3 X et 1/10 volume de DTT (DiThioThréitol) dilués à 1 X avec de l'eau dans un volume final de 100 µl. La concentration en protéines totales a été évaluée avec un fluoromètre de type *Qubit*. Les échantillons protéiques (20 µg) sont solubilisés dans un tampon Laemmli 4 X supplémenté en β-mercaptoéthanol 5 % puis chauffés pendant 5 min à 95 °C. Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE (10 % en bis-acrylamide) pendant 1 h 30 à 125 V. Le transfert est réalisé sur une membrane de nitrocellulose (BioRad, Paris, France) pendant 7 min (système de transfert iBlot™, Invitrogen). Les anticorps et les dilutions (dans du lait TBS-T) utilisés par la suite sont les suivants : lapin anti-IKKβ humain (1:1000ème), souris anti-IκBα (1:1000ème) lapin anti-NF-κB humain (1:1000ème) et souris anti-β-actine humaine (1:20000ème) (Cell Signaling Technology). Les bandes spécifiques sont visualisées par la technique de chimioluminescence par une caméra de révélation (Chemidoc, BioRad).

Les surnageants ont été récupérés et congelés. L'IL-8 a été dosé par ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) à l'aide du kit *human IL-8 Duo Set Kit* (R&D Systems, Lille, France) suivant les instructions du fabricant, dans les surnageants de culture de cellules.

2. Contexte pro-/anti-inflammatoire

1) Contexte pro-inflammatoire

Nos résultats ont montré que miR-199a-3p est sous-exprimé dans les cellules CF par rapport aux cellules non-CF. Nous nous sommes donc intéressés aux raisons de cette dérégulation dans le contexte CF et avons testé plusieurs hypothèses.

Pour déterminer si le miR-199a-3p est sous la dépendance de l'état inflammatoire préexistant au niveau pulmonaire, nous avons mesuré les répercussions d'une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β 10 ng/mL, TNF-α 10 ng/mL et IL-1β + TNF-α 1 ng/mL) sur des cellules CF pendant 6, 24 et 48 h.

Une stimulation par l'IL-1β ou TNF-α seul ou en combinaison pendant 6h semble légèrement augmenter la sécrétion en IL-8 par rapport au contrôle (figure 43, A). Vingt-quatre heures de stimulation par les cytokines pro-inflammatoires entraînent une augmentation de la sécrétion en IL-8, celle-ci est d'autant plus importante avec une stimulation par du TNF-α et la combinaison des deux cytokines montre un effet synergique sur la sécrétion en IL-8 (figure 43, C). La sécrétion en IL-8 étant plus faible à 48 h (figure 43, E), nous n'avons pas réitéré l'expérience, ni mesuré l'expression de miR-199-3p.
Après 6 h de stimulation, l'expression de miR-199a-3p diminue significativement dans la condition de stimulation par de l'IL-1β et tend à diminuer avec le TNF-α à la dose de 10 ng/mL par rapport à la condition contrôle (figure 43, B).

Cette diminution n'est pas plus importante dans la condition où nous avons co-stimulé les cellules CF avec l'IL-1β et le TNF-α à la dose de 1 ng/mL pendant 6 h. En augmentant la durée de la stimulation à 24 h, nous observons que l'expression du miR-199a-3p qui diminuait de 10 % à 6 h, diminue de 43 % à 24 h pour la condition de co-stimulation IL-1β + TNF-α (1 ng/mL) mais pas de manière significative (figure 43, D).

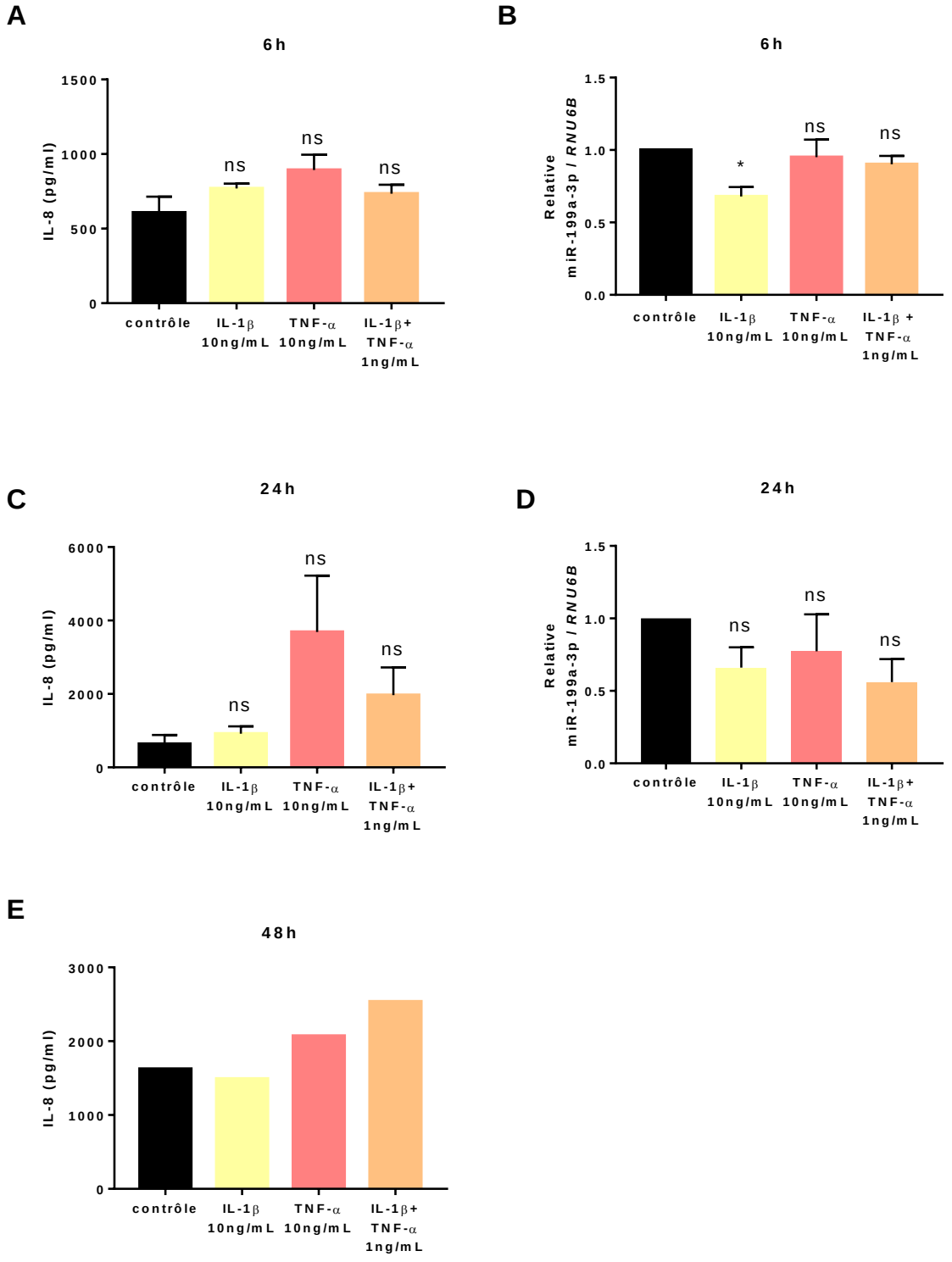


Figure 43 : Effets d'une stimulation pro-inflammatoire sur l'expression de miR-199a-3p. Effet d'une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β ± TNF-α) pendant 6, 24, 48 h sur la sécrétion en IL-8 (A, n=3 ; C, n=4 ; E, n=1) et sur l'expression de miR-199a-3p rapportée au *RNU6B* (B, n=5, p=0,0302 pour IL-1 β ; D, n=4) dans des cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-). Un test d'ANOVA a été utilisé pour déterminer la significativité.

En sur-exprimant le miR-199a-3p, nous avons montré que cela entraînait une diminution de l'activation de la voie de signalisation NF-κB et par conséquent diminuait l'inflammation chez les patients CF. Aussi, nous nous sommes demandé si en transfectant un mimic du miR-199a-3p puis en stimulant les cellules CF avec de l'IL-1β et du TNF-α pendant 24 h, nous étions capables de conserver ces effets ou non.

La transfection du mimic de miR-199a-3p pendant 24 h puis suivie d'une stimulation par l'IL-1β et du TNF-α pendant 24 h semble montrer que l'expression du miR-199a-3p est toujours augmentée (figure 44, A). Cependant, malgré l'augmentation de l'expression du miR-199a-3p, la stimulation par la combinaison des cytokines pro-inflammatoires ne semble pas varier l'expression protéique d'IKKβ, IκBα et NF-κB (figure 44, B) mais augmenter l'activité de NF-κB et de la sécrétion en IL-8 (figure 44, C et D) et non une diminution de ces deux paramètres comme retrouvés en condition de transfection du mimic de miR-199a-3p seul.

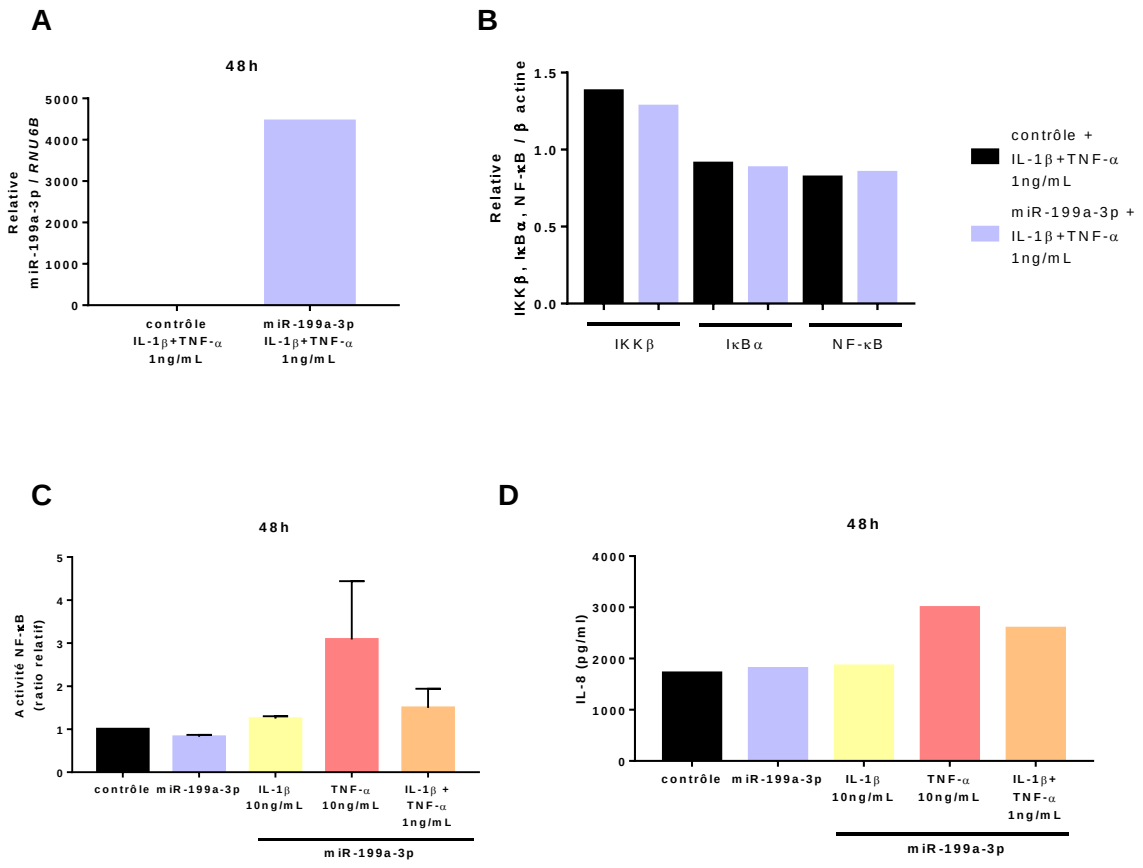


Figure 44 : Effet d'une surexpression de miR-199a-3p puis d'une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β ± TNF-α) pendant 48 h sur l'expression de miR-199a-3p et l'activation de la voie NF-κB. Quantification de l'expression de miR-199a-3p (A, n=1), des expressions protéiques d'IKKβ, IκBα et NF-κB (B, n=1), de l'activité NF-κB (C, n=2) et de la sécrétion en IL-8 (D, n=1) dans des cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-).

Le contexte pro-inflammatoire semble influencer l'expression du miR-199a-3p mais la co-transfection/stimulation semble montrer que le contexte inflammatoire peut augmenter l'activité NF-κB et la sécrétion en IL-8, malgré la présence du miR-199a-3p dans la cellule. Aussi son implication dans l'origine de la dérégulation de miR-199a-3p n'est pas avérée dans le modèle étudié.

2) Contexte anti-inflammatoire

Bien que le contexte pro-inflammatoire ne semble pas être à l'origine de la dérégulation de l'expression de miR-199a-3p, nous souhaitions déterminer si l'utilisation d'un anti-inflammatoire tel que la dexaméthasone : traitement utilisé par les patients CF pour traiter leur hyper-inflammation, pouvait éventuellement moduler l'expression de miR-199a-3p.

Pour cela des cellules CF ont été mises à jeun puis stimulées avec différentes concentrations de DMX pendant 6 h puis l'expression du miR-199a-3p a été mesurée par RT-qPCR. Nous observons qu'une forte concentration de dexaméthasone (1 µg) semble entraîner une augmentation de l'expression de miR-199a-3p mais que de faibles concentrations tendent plutôt à diminuer l'expression de ce miARN (figure 45).

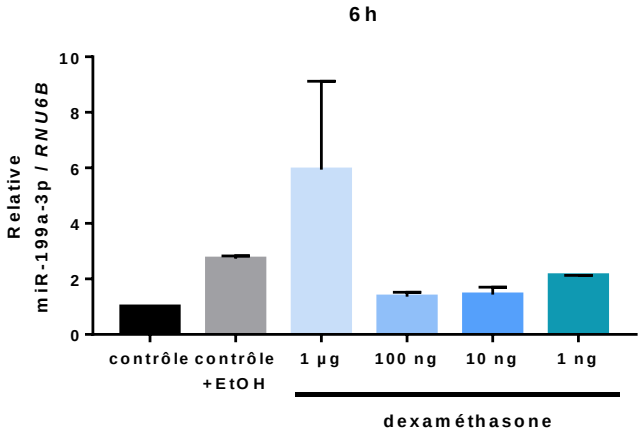


Figure 45 : Conséquence d'une stimulation anti-inflammatoire sur l'expression de miR-199a-3p. Effet d'une stimulation par de la dexaméthasone pendant 6 h sur l'expression de miR-199a-3p rapportée au *RNU6B* dans des cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-) (n=2).

3. Dysfonction intrinsèque de *CFTR*

Dans un premier temps, nous avons testé l'impact d'une stimulation par l'inhibiteur 172 ou par la combinaison Vx-809/Vx-770 dans nos cellules sur l'activité chlorure de CFTR.

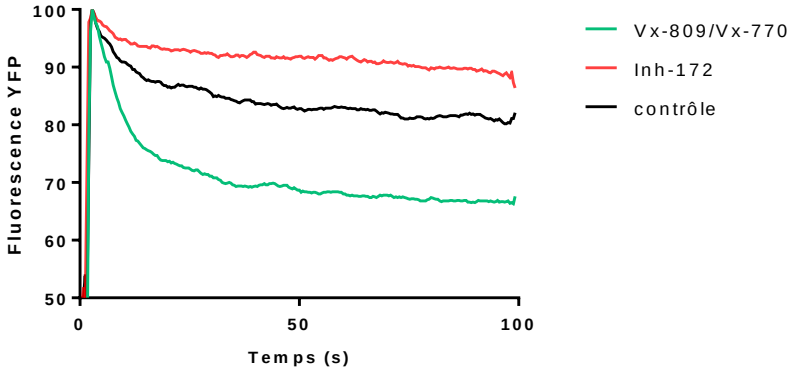


Figure 46 : Effet de l'inhibiteur 172 et de la combinaison Vx-809/Vx-770 sur l'activité chlorure liée à CFTR dans des cellules épithéliales CF. Des cellules épithéliales pulmonaires CF (CFBE41o-) ont été stimulées avec l'inhibiteur 172 (10 µM) ou la combinaison des molécules Vertex 809 (1 µM) et 770 (0.1 µM) pendant 24 h (n=1).

L'utilisation de l'inhibiteur 172 à une concentration de 10 µM augmente l'activité chlorure liée à CFTR dans les cellules épithéliales CF par rapport aux cellules non stimulées. La stimulation par l'Orkambi Vx-809/Vx-770 aux concentrations respectives de 1 µM et 0.1 µM diminue l'activité chlorure liée à CFTR dans les cellules épithéliales CF par rapport aux cellules non stimulées (figure 46).

La conductance Cl^- de CFTR peut donc être inhibée par l'inhibiteur 172 de CFTR. Nous avons mesuré les conséquences de son utilisation sur l'expression de miR-199a-3p dans des cellules non-CF (16HBE14o-). La mutation F508del altère la maturation de la protéine CFTR et l'utilisation de la combinaison Vx-809/Vx-770 permet le réadressage d'une partie des protéines CFTR non matures accumulées dans le RE à la membrane cellulaire et leurs activations. Nous avons mesuré les conséquences de son utilisation sur l'expression de miR-199a-3p dans des cellules CF (CFBE41o-). Nous avons donc quantifié l'expression de miR-199a-3p par RT-qPCR dans des cellules non-CF et CF suite à ces deux traitements.

L'expression de miR-199a-3p semble augmenter de manière non significative lorsque les cellules non-CF sont traitées avec l'inhibiteur 172 de CFTR (figure 47, A). La présence ou non d'une conductance chlorure liée à CFTR semble moduler l'expression de miR-199a-3p.

L'expression de miR-199a-3p ne varie pas lorsque les cellules CF sont traitées avec la combinaison des molécules Vx-809/Vx-770 (figure 47, B). Le ré-adressage à la membrane d'une protéine CFTR mutée n'a pas d'effet sur l'expression de miR-199a-3p.

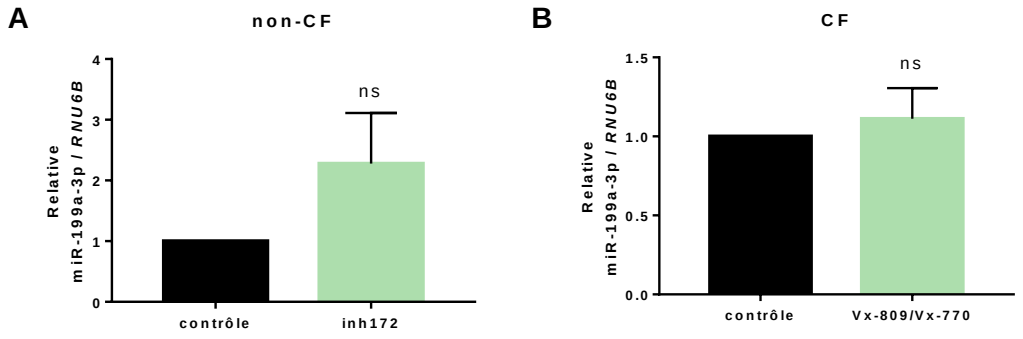


Figure 47 : Effet d'une modulation de l'activité de CFTR sur l'expression de miR-199a-3p. A : Des cellules non-CF (16HBE14o-) ont été stimulées avec l'inhibiteur-172 (10 µM) ou non pendant 24 h (n=5, p=0.3719). B : Des cellules CF (CFBE41o-) ont été stimulées par une combinaison des molécules Vertex 809 (1 µM) et 770 (0.1 µM) ou non pendant 24 h (n=5, p=0.7504). Un test t de *Student* a été utilisé pour déterminer la significativité.

4. Modulation calcique

Des travaux antérieurs du laboratoire ont montré qu'un défaut de la protéine CFTR menait à un défaut de sa fonction chlorure entraînant alors une augmentation de $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$ à l'origine de l'hyper-activation de la voie NF-κB. Cependant le lien direct entre la variation du flux calcique et l'activation de cette voie n'est pas connu. D'après nos résultats précédents, miR-199a-3p régule l'activation de la voie NF-κB en ciblant le 3'-UTR d'*IKBKB* mais on ne connaît pas l'origine de la dérégulation de l'expression du miR-199a-3p dans le contexte de la mucoviscidose. Le miR-199a-3p pourrait être l'acteur intermédiaire entre le calcium et la voie NF-κB.

Nous avons stimulé des cellules non-CF avec de la ionomycine, un activateur calcique permettant le relargage du calcium issu du RE entraînant une augmentation de la $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$, à différentes concentrations (figure 48, A).

Cependant, suite à cette stimulation et bien qu'elle entraîne une augmentation de la sécrétion en IL-8 sans entraîner de modification de la morphologie des cellules, les expériences n'ont pas été reproductibles en raison de l'instabilité du contrôle endogène lors de la mesure de l'expression de miR-199a-3p, suite à cette stimulation.

Nous avons donc changé d'activateur calcique et continué avec de la thapsigargine, un activateur calcique induisant une augmentation stable de calcium dans la cellule (figure 48, B). On observe notamment que la ionomycine entraîne un pic calcique contrairement à la thapsigargine qui entraîne une augmentation plus stable de la $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$ ce qui nous a permis de mesurer l'impact d'une modulation calcique sur l'expression de miR-199a-3p.

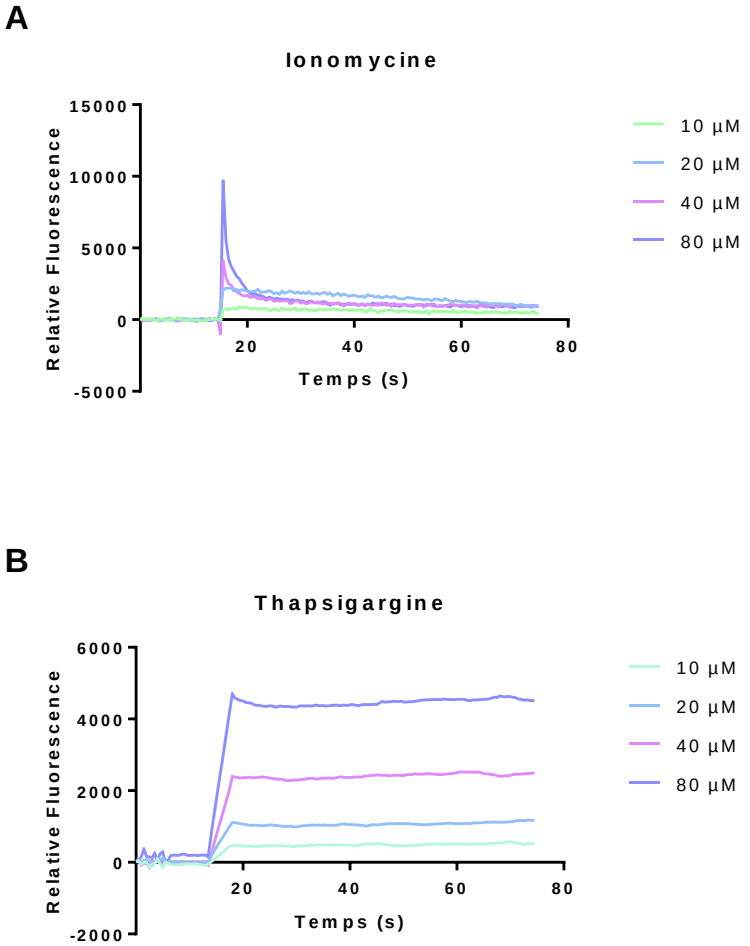


Figure 48 : Effet de la ionomycine et de la thapsigargine sur la modulation de la $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$ dans des cellules épithéliales non-CF. Des cellules épithéliales pulmonaires non-CF (16HBE14o-) ont été stimulées avec de la ionomycine ou de la thapsigargine à différentes concentrations (10, 20, 40, 80 µM) pendant 80 sec (n=1).

Comme nous souhaitions effectuer un temps de stimulation plus long, nous avons sélectionné une gamme de concentration de thapsigargine plus faible. Des cellules épithéliales non-CF ont donc été stimulées avec de la thapsigargine pendant 24 h à différentes concentration pour augmenter la $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$. De la même façon des cellules CF ont été stimulées avec du bapta-AM pendant 24 h à différentes concentrations pour diminuer la $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$. La sécrétion en IL-8 a été mesurée par ELISA et a montré une augmentation de la sécrétion de cette cytokine suite à une stimulation par de la thapsigargine et une diminution suite à une stimulation par du bapta (données non montrées).

Nous avons ensuite quantifié l'expression de miR-199a-3p et des deux gènes (pre-miR-199a-1 et pre-miR-199a-2) pouvant le synthétiser par RT-qPCR dans des cellules non-CF et CF suite à ces deux traitements.

Dans les cellules non-CF, une stimulation par de la thapsigargine pendant 24 h semble diminuer l'expression de miR-199a-3p de manière concentration dépendante (figure 49, A). L'expression du pre-miR-199a-1 est plus fortement diminuée suite à la stimulation, et cette diminution est même significative avec la concentration de 0,25 µM par rapport à la condition contrôle (figure 49, C). L'expression du pre-miR-199a-2 ne suit pas les mêmes tendances que les deux mesures précédentes. En effet, l'expression du pre-miR-199a-2 semble diminuer avec de faibles concentrations de thapsigargine mais semble augmenter avec de fortes concentrations de cette molécule (figure 49, E).

Dans les cellules CF, une stimulation par du bapta-AM pendant 24 h semble augmenter l'expression de miR-199a-3p et cela de manière significative avec les concentrations de 0,5 µM et 2 µM (figure 49, B). L'expression du pre-miR-199a-1 semble varier de la même manière que le miARN, que ce gène synthétise (figure 49, D) avec une augmentation significative à la concentration 0,5 µM. L'expression du pre-miR-199a-2 ne suit pas les mêmes tendances que les deux mesures précédentes et son profil d'expression semble anarchique avec une grande variabilité d'expression (figure 49, F).

Le miR-199a-3p semble être synthétisé par le pre-miR-199a-1 dans des cellules épithéliales pulmonaires qu'elles soient CF ou non-CF et non pas par le pre-miR-199a-2 dans ces modèles. Une augmentation de la $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$ par la thapsigargine entraîne une diminution de l'expression de miR-199a-3p *via* la modulation de l'expression du pre-miR-199a-1 dans des cellules non-CF. De plus une diminution de la $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$ par le bapta-AM entraîne une augmentation significative de l'expression de miR-199a-3p *via* la modulation de l'expression du pre-miR-199a-1 dans des cellules CF.

Une variation de la $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$ pourrait donc être à l'origine de la dérégulation de l'expression de miR-199a-3p dans les cellules CF.

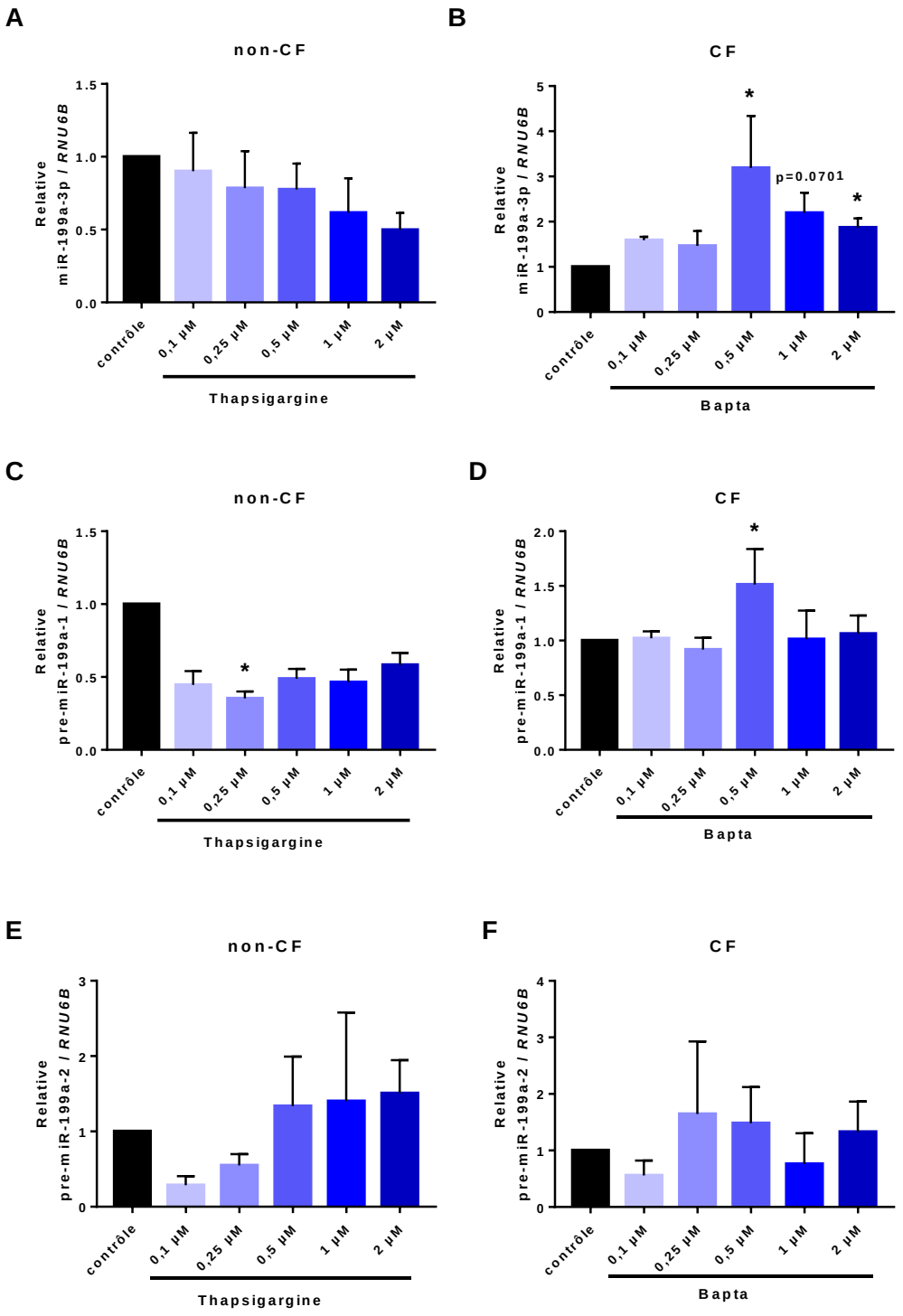


Figure 49 : Effet d'une modulation calcique sur l'expression de miR-199a-3p et les gènes qui le synthétisent. Des cellules non-CF (16HBE14o-) ont été stimulées avec de la thapsigargine à différentes concentrations ou non pendant 24 h, l'expression du miR-199a-3p (A, ns), du pre-miR-199a-1 (C, p=0.0125 pour la condition 0.25 µM et ns pour les autres) et du pre-miR-199a-2 (E, ns) ont été mesurées (n=4). Des cellules CF (CFBE41o-) ont été stimulées avec du bapta-AM à différentes concentrations ou non pendant 24 h, l'expression du miR-199a-3p (B, p=0.0229 (0.5 µM), p=0.0408 (2 µM) et ns pour les autres), du pre-miR-199a-1 (D, p=0.029 (0.5 µM) et ns pour les autres) et du pre-miR-199a-2 (F, ns) ont été mesurées (n=4). Un test de *Friedman* a été utilisé pour déterminer la significativité.

5. Infection par *Pseudomonas aeruginosa*

Dans les VA des patients adultes CF, le pathogène le plus fréquemment retrouvé est *P. aeruginosa*. Nous nous sommes donc intéressés à l'impact éventuel d'une stimulation par cette bactérie sur l'expression de miR-199a-3p.

Des cellules CF ont été stimulées avec une souche PAK de *P. aeruginosa* morte pendant 24 h à une MOI (*Multiplicity Of Infection*) de 0,25. La souche a été chauffée à 65 °C au bain marie pendant 15 minutes pour tuer les bactéries sans altérer les facteurs de virulence (LPS et flagelline) permettant ainsi à la bactérie d'infecter nos cellules sur des temps plus long, de 24 h. Nous observons qu'une stimulation par la souche PAK MOI 0,25 morte pendant 24 h entraîne une augmentation significative de l'expression en ARNm d'*IL-8* (figure 50, A) ainsi que de sa sécrétion (figure 50, B) et une diminution significative de l'expression de miR-199a-3p (figure 50, C).

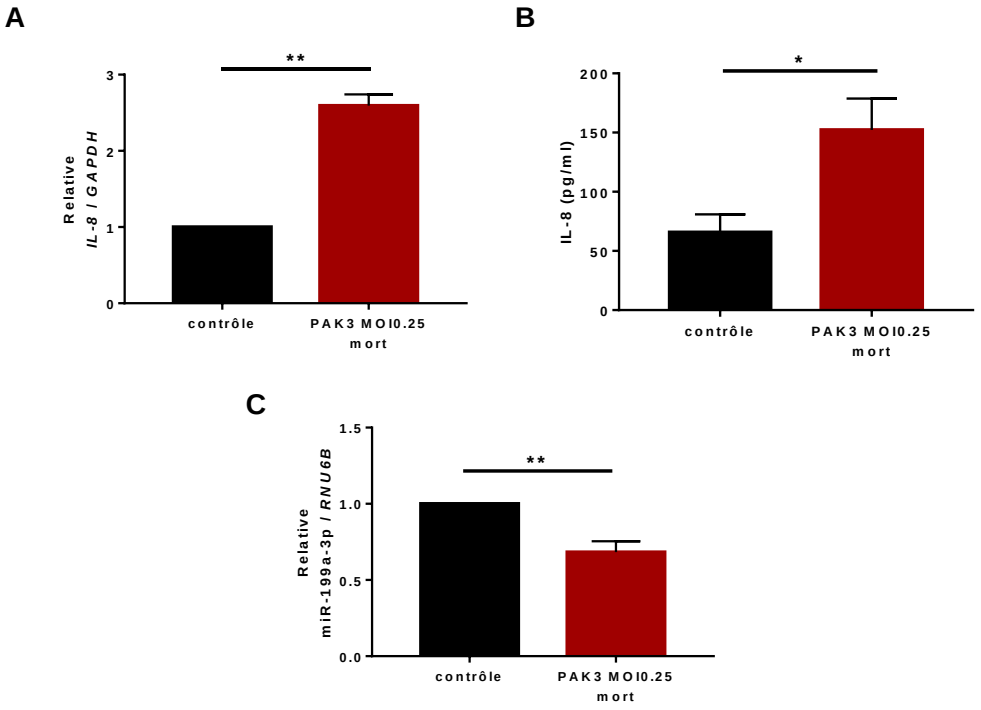


Figure 50 : Effet d'une infection par *Pseudomonas aeruginosa* sur l'expression de miR-199a-3p. L'expression en ARNm de l'*IL-8* (A, p=0.0017), la sécrétion en IL-8 (B, p=0.0112) et l'expression de miR-199a-3p (C, p=0.0031) ont été mesurées dans des cellules CF (CFBE41o-) qui ont été stimulées par une souche PAK de *P. aeruginosa* à une MOI 0.25 morte, ou non stimultées pendant 24 h (n=4). Un test t de *Student* a été utilisé pour déterminer la significativité.

Une infection par la bactérie *P. aeruginosa* diminue de manière significative l'expression de miR-199a-3p. Associé aux résultats retrouvés dans le *small RNAseq*, ce résultat suppose qu'une infection altère encore plus la dérégulation de l'expression de miR-199a-3p dans les cellules CF.

6. Conclusion

Une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β ± TNF-α) dans des cellules CF montre une modulation de l'expression de miR-199a-3p mais n'explique pas l'origine de sa dérégulation puisque nous avons vu qu'une stimulation par ces cytokines post-transfection du mimic de miR-199a-3p, ne semblait pas entraîner de modulation de l'expression de celui-ci. Un traitement par de la dexaméthasone à une forte concentration (1 µg) semble augmenter l'expression de miR-199a-3p mais n'entraîne aucune variation à de plus faibles concentrations. La modulation de l'activité de CFTR *via* l'inhibiteur 172 ou la combinaison des molécules Vx-809/Vx-770 dans des cellules non-CF et CF n'entraîne aucune variation de l'expression de miR-199a-3p. Par contre, une modulation de la concentration intracellulaire de calcium a permis de mettre en évidence qu'une diminution de celle-ci dans des cellules CF entraînait une augmentation significative de l'expression de miR-199a-3p et cela *via* la modulation de l'expression du gène qui le synthétise à savoir le pre-miR-199a-1. Des résultats similaires dans des cellules non-CF ont été retrouvés.

Enfin, une stimulation par une souche de *P. aeruginosa*, nous a permis de montrer que cette bactérie diminuait de manière significative l'expression de miR-199a-3p et par conséquent favorisait l'activation de la voie NF-κB.

III. Interaction entre les miARN

Il a toujours été montré qu'un miARN pouvait réguler plusieurs cibles ARNm et qu'un ARNm pouvait être régulé par plusieurs miARN. Mais très peu d'études se sont intéressées à la possible interaction entre les miARN eux-mêmes. Est-ce que cette régulation existe ? Se fait-elle directement de séquence à séquence ? Ou bien est-ce qu'un miARN peut agir sur un gène synthétisant un autre miARN ?

Dans cette partie, nous avons sélectionné trois miARN :

- Le miR-199a-3p, capable de réguler l'activation de la voie NF-κB et qui semble être un intermédiaire entre la dysfonction intrinsèque de CFTR, la modulation calcique et l'activation de cette voie.
- Le miR-636, dont l'expression a été montrée comme étant augmentée dans le *small RNAseq* et qui semble agir sur l'inflammation aussi (*cf* partie IV – article miR-636)
- Le miR-9-5p, dont l'expression est augmentée chez les patients CF et semble être un régulateur de l'expression d'un canal Cl^- annexe de CFTR, ANO1 (Sonneville et al., 2017) et qui pourrait réguler NFκB1 (Guo et al., 2009; Ma et al., 2011), l'une des sous-unité de NF-κB.

Ces trois miARN sont donc liés à l'inflammation et proche de la voie de signalisation NF-κB.

1. Matériels et Méthodes

Nous avons transfecté des cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-) avec un mimic de miR-199a-3p (hsa-miR-199a-3p), un mimic de miR-636 (hsa-miR-636), un mimic de miR-9-5p (hsa-miR-9-5p) ou un mimic contrôle (Life technologies, Saint Aubin, France) à des concentrations de 15 ou 30 nM pendant 48 h avec l'agent de transfection *HiPerfect* (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Les séquences des mimic du miR-199a-3p, miR-636 et miR-9-5p sont les suivantes :

miARN	SEQUENCE DU MIMIC
miR-199a-3p	5'- ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA -3'
miR-636	5'- UGUGCUUGCUCGUCCCGCCCGCA -3'
miR-9-5p	5'- UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA -3'

Tableau 10 : Tableau représentant les séquences des mimic spécifiques des trois miARN utilisés pour ce projet (miR-199a-3p, miR-636, miR-9-5p).

Les ARN et miARN ont été extraits à l'aide du kit *Nucleospin miRNA* (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) selon le protocole fourni, dans un volume d'élution final de 30 µL. La concentration et la qualité des ARN et des miARN sont déterminées par Nanodrop.

L'obtention d'ADNc se fait à partir de 20 ng des miARN totaux, à l'aide du kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit* (Life technologies) selon le protocole fourni dans le kit, dans un volume réactionnel de 15 µL et à partir de 1 µg des ARN totaux, à l'aide du kit *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Life technologies) selon le protocole fourni, avec un volume réactionnel final de 20 µL. Les expériences de RT-qPCR (TaqMan) ont été réalisées avec les sondes hsa-miR-199a-3p (0002304), hsa-miR-636 (002088), hsa-miR-9-5p (000583), hsa-miR-144 (002676) et *RNU6B* (001093) comme contrôle endogène, *DNM3* (Hs00927946) et *GAPDH* (Hs02786624_g1) comme contrôle endogène. Pour chaque gène et chaque condition, la qPCR est réalisée en triplicat, avec 1 µL d'ADNc en présence de *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix 2X* (Life technologies) dans un volume réactionnel final de 10 µL. Les qPCR sont effectuées avec le thermocycler *StepOnePlus* (Applied Biosystems).

Afin d'étudier la liaison de miR-9-5p au 3'-UTR de *NFKB1*, la région 3'-UTR de *NFKB1* correspondant à la région non traduite prédite pour être ciblée par le miR-9-5p, a été clonée avec le gène de la luciférase Gaussia dans un plasmide générant un vecteur luc-NFKB1 (pEZX-MT05, Genecopoeia, USA). Les cellules ont été transfectées avec le plasmide (1 µg/mL), utilisant l'ExGen500 comme agent de transfection (Euromedex, Souffelweyersheim, France) en présence du mimic de miR-9-5p ou du mimic contrôle (30 nM). Quarante-huit heures après la transfection, la luminescence a été mesurée en utilisant le kit *Secret-Pair Dual Luminescence Assay Kit* (Genecopoeia). Deux activités de chimioluminescence sont mesurées : la luciférase Gaussia, une protéine enzymatique sécrétée qui émet de la luminescence par oxydation de la luciférine, et la phosphatase alcaline embryonnaire sécrétée (SEAP), protéine extrêmement stable utilisée comme rapporteur endogène.

Les protéines nucléaires ont été extraites grâce au kit *Nuclear Extract* (Active Motif, Rixensart, Belgique), en suivant les instructions du fabricant. La concentration en protéines totales est évaluée avec un fluoromètre de type *Qubit* (Thermofisher). L'activation de la transcription du facteur nucléaire NF-κB (sous-unité p65) a ensuite été déterminée en utilisant le kit *TransAM™ Transcription Factor Assay* (Active Motif). Les extraits nucléaires ont été déposés dans des puits au fond desquels se trouve fixé un oligonucléotide contenant la séquence consensus « κB », séquence de fixation de NF-κB. La liaison de NF-κB sur son site consensus est révélée par l'addition d'un anticorps primaire qui reconnaît spécifiquement un épitope de la sous-unité p65 de NF-κB. L'anticorps secondaire conjugué à l'HRP est ajouté et la réaction colorimétrique qui se produit est mesurée par spectrophotomètre à 450 nm. Les valeurs obtenues sont normalisées à la quantité totale de protéines nucléaires extraites pour chaque échantillon.

Les surnageants des cellules transfectées avec les mimic des miR-199a-3p, miR-636, miR-9-5p ou le mimic contrôle ont été récupérés 48 h après la transfection. La concentration en IL-8 et IL-6 de chaque échantillon est déterminée par le kit ELISA *human IL-8 Duo Set Kit et human IL-6 Duo Set Kit* (R&D Systems, France) suivant les instructions du fabricant.

2. Régulation de NFκB1 par miR-9-5p

Nous avons co-transfecté des cellules CF (CFBE41o-) avec un plasmide luciférase couplé au 3'-UTR de *NFKB1* et le mimic de miR-9-5p ou un mimic contrôle pendant 48 h. Les résultats montrent qu'une surexpression de miR-9-5p semble entraîner une diminution de l'activité luciférase du plasmide de NFκB1 de 15% (figure 51). Les résultats nécessiteront d'être confirmés pour devenir statistiques mais il semblerait que miR-9-5p soit capable de se fixer au 3'-UTR de *NFKB1*.

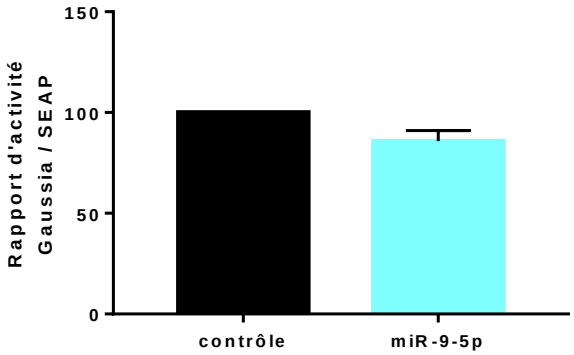


Figure 51 : Etude de la liaison du miR-9-5p au 3'-UTR de *NFKB1*. Quantification de l'activité luciférase normalisée par l'activité SEAP dans des cellules CF (CFBE41o-) co-transfectées avec un plasmide luciférase 3'-UTR de *NFKB1* et le mimic de miR-9-5p ou un mimic contrôle (n=2).

3. Interaction entre miR-199a-3p, miR-636 et miR-9-5p

Des cellules CF (CFBE41o-) ont été transfectées avec soit un mimic de miR-199a-3p, un mimic de miR-636, un mimic de miR-9-5p ou un mimic contrôle à la concentration de 30 nM pendant 48 h puis l'expression des autres a été mesurée par RT-qPCR.

La surexpression de miR-199a-3p dans des cellules CF augmente significativement l'expression de miR-9-5p (figure 52, A) et l'expression de miR-636 (figure 52, B). La surexpression de miR-636 dans des cellules CF augmente significativement l'expression de miR-199a-3p (figure 52, C) et semble augmenter l'expression de miR-9-5p (figure 52, D). La surexpression de miR-9-5p dans des cellules CF ne module ni l'expression de miR-199a-3p (figure 52, E) ni l'expression de miR-636 (figure 52, F).

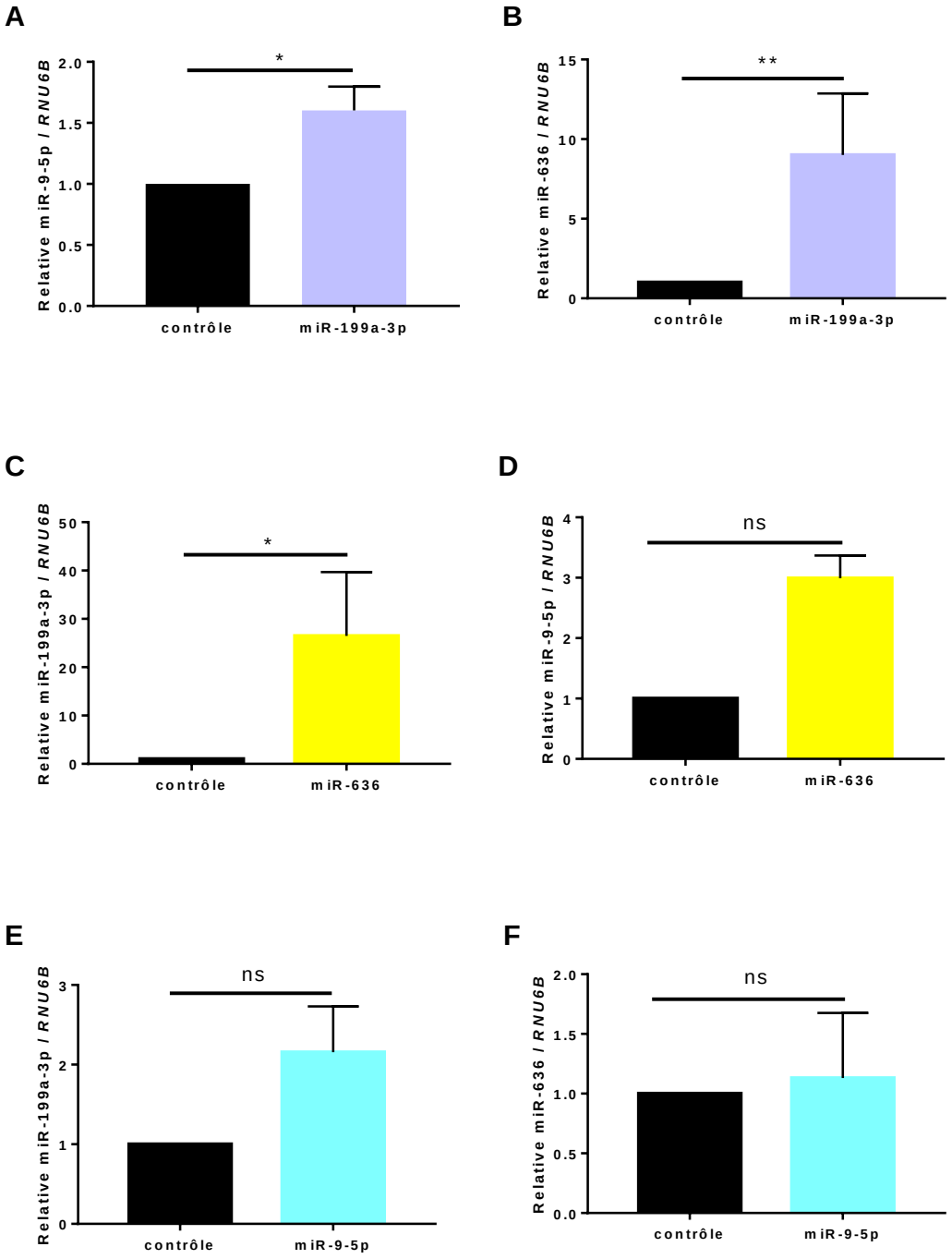


Figure 52 : Effet de la transfection d'un mimic de miR-199a-3p, miR-636 ou miR-9-5p sur l'expression des deux autres. Quantification de l'expression de miR-9-5p (A, n=5, p=0.0322) et miR-636 (B, n=6, p=0.0079) rapportée au *RNU6B* dans des cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-) transfectées avec un mimic de miR-199a-3p ou un mimic contrôle pendant 48 h. Quantification de l'expression de miR-199a-3p (C, n=6, p=0.0164) et miR-9-5p (D, n=6, p=0.0802) rapportée au *RNU6B* dans des cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-) transfectées avec un mimic de miR-636 ou un mimic contrôle pendant 48 h. Quantification de l'expression de miR-199a-3p (E, n=5, p=0.5924) et miR-636 (F, n=4, p=0.9939) rapportée au *RNU6B* dans des cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-) transfectées avec un mimic de miR-9-5p ou un mimic contrôle pendant 48 h. Un test t de *Student* a été utilisé pour déterminer la significativité.

4. Lien entre miR-9-5p et miR-199a-3p

De manière étonnante la surexpression de miR-9-5p dans des cellules CF n'entraîne pas de modulation de l'expression de miR-199a-3p. Pourtant d'après la base de données *e!Ensembl* (https://www.ensembl.org/index.html), l'un des gènes, incluant le gène de synthèse de miR-199a-3p (pre-miR-199a-2), la dynamine 3 possède un site de fixation complémentaire à la séquence de miR-9-5p d'après 3 bases de données sur 4 (tableau 11).

	GENE		MiARN	miRWalk	miRanda	RNA22	Targetscan	SUM
miR-199a-3p	miR-199a-1	*DNM2*	hsa-miR-636	0	0	1	0	1
			hsa-miR-9-5p-5p	0	0	0	0	0
	miR-199a-2	*DNM3*	hsa-miR-636	0	0	0	0	0
			hsa-miR-9-5p-5p	1	1	0	1	3

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des miARN prédits pour cibler les gènes de la dynamine 2 et 3, qui synthétisent le miR-199a-3p d'après différentes bases de données.

Aussi nous avons mesuré l'expression de la dynamine 3 suite à une surexpression de miR-9-5p dans des cellules CF.

La surexpression de miR-9-5p *via* la transfection d'un mimic de ce miARN n'entraîne aucune variation de l'expression de la dynamine 3 (figure 53). Le miR-9-5p ne module donc pas l'expression de la dynamine 3 ni l'expression de miR-199a-3p.

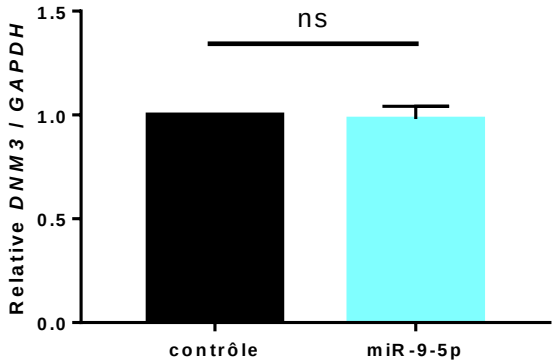


Figure 53 : Effet de la surexpression de miR-9-5p sur l'expression de la dynamine 3, gène incluant le miR-199a-3p. Quantification de l'expression de la dynamine 3 rapportée à la *GAPDH* dans des cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-) transfectées avec un mimic de miR-9-5p ou un mimic contrôle pendant 48 h (n=6, p=0.6569). Un test t de *Student* a été utilisé pour déterminer la significativité.

5. Spécificité des transfections

Nous avons vérifié la spécificité de la transfection des différents mimic en quantifiant l'expression d'un autre miARN, le miR-144 après la transfection de chacun des mimic. Le miR-144 a été sélectionné de manière aléatoire, le seul critère choisi était qu'il n'ait pas été montré comme régulant la voie NF-κB.

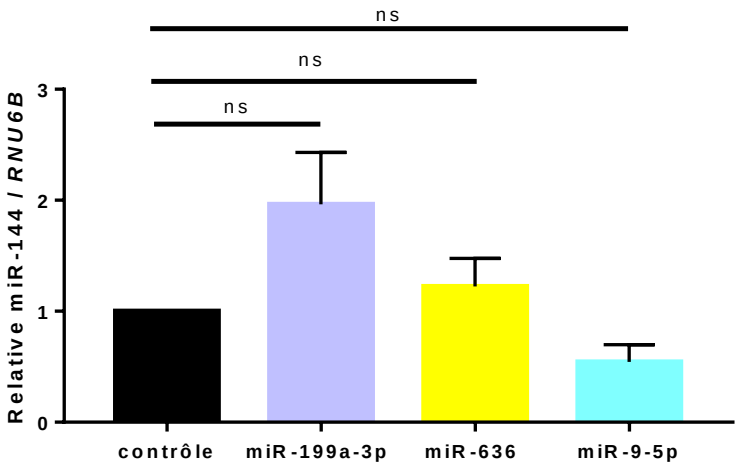


Figure 54 : Effet de la transfection d'un mimic de miR-199a-3p, miR-636 ou miR-9-5p sur l'expression de miR-144. Quantification de l'expression de miR-144 rapportée au *RNU6B* dans des cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-) transfectées avec un mimic de miR-199a-3p (p=0.1463), miR-636 (p=0.7549), miR-9-5p (p=0.8882) ou un mimic contrôle pendant 48 h (n=6, 6, 4). Un test t de *Student* a été utilisé pour déterminer la significativité.

Alors que nous avions observé précédemment que l'expression d'un miARN pouvait être augmenté suite à la transfection d'un mimic d'un autre miARN, nous n'observons pas de différence significative au niveau de l'expression du miR-144 lorsque miR-199a-3p, miR-636 ou miR-9-5p est surexprimé par rapport à la condition contrôle (figure 54).

La modulation de l'expression de miR-636 et miR-9-5p par le miR-199a-3p et la modulation de l'expression de miR-199a-3p par le miR-636 sont donc spécifiques.

6. Impact de la co-transfection de deux miARN sur l'activité NF-κB, la sécrétion en IL-8 et IL-6

Ces trois miARN étant liés à l'inflammation et proche de la voie de signalisation NF-κB, nous avons mesuré l'impact d'une surexpression de miR-199a-3p, miR-9-5p et miR-636, seuls ou en combinaison sur l'activité de NF-κB ainsi que sur la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-8 et IL-6.

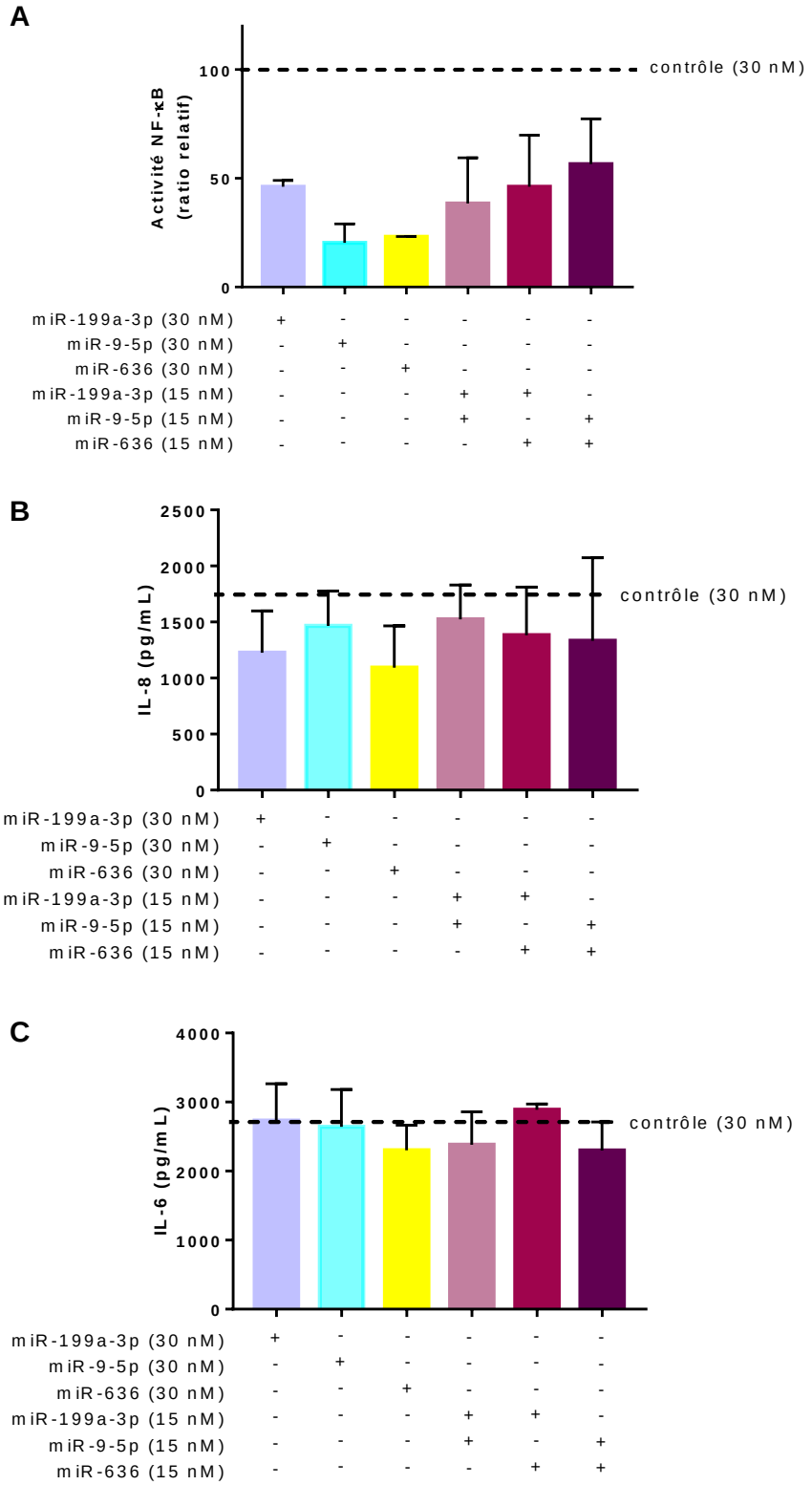


Figure 55 : Effet des transfections et co-transfection d'un mimic de miR-199a-3p, miR-636 et miR-9-5p sur l'activité de NF-κB et la sécrétion en IL-8, IL6. Quantification de l'activité de NF-κB mesurée par TransAM (A, n=2) des protéines nucléaires NF-κB et dosage de la sécrétion en IL-8 (B, n=2) et IL-6 (C, n=2) dans les surnageants de cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-) transfectées avec un mimic de miR-199a-3p, un mimic de miR-9-5p, un mimic de miR-636 ou un mimic contrôle pendant 48 h.

Nous observons que seuls, miR-199a-3p, miR-9-5p et miR-636 entraînent une diminution de l'activité NF-κB à la concentration de 30 nM (figure 55, A). Lorsque l'on combine deux miARN à la concentration de 15 nM chacun pour une concentration finale de 30 nM, on observe aussi une diminution de l'activité NF-κB mais pas moins faible qu'avec un miARN tout seul, quelque soit la combinaison.

De la même manière pour la sécrétion en IL-8, les trois miARN diminuent cette sécrétion lorsqu'on les transfecte seuls, mais en combinaison, nous observons des résultats plus variables et tout comme pour l'activité NF-κB, la diminution de la sécrétion en IL-8 n'est pas moins faible avec la combinaison de deux miARN qu'avec un miARN tout seul, et cela quelque soit la combinaison (figure 55, B).

Concernant la sécrétion en IL-6, les résultats ne sont pas identiques. En effet, si suite à une surexpression de miR-199a-3p ou miR-9-5p, on n'observe pas de modulation de sa sécrétion, la surexpression de miR-636 entraîne une diminution de la sécrétion en IL-6 (figure 55, C). Pour les combinaisons du miR-199a-3p / miR-9-5p et miR-9-5p / miR-636, on observe une diminution de la sécrétion en IL-6 mais pas pour celle du miR-199a-3p / miR-636.

7. Conclusion

Nous avons montré que miR-9-5p semblait être capable de se fixer au 3'-UTR de NFKB1 et donc ciblait la voie NF-κB comme miR-199a-3p (*cf* partie I) et miR-636 (cf partie VI). La surexpression de miR-199a-3p permet d'augmenter l'expression de miR-636 et de miR-9-5p. La surexpression de miR-636 permet d'augmenter l'expression de miR-199a-3p mais apparemment pas celle de miR-9-5p. La surexpression de miR-9-5p n'influence ni miR-199a-3p ni miR-636. Cette interaction ne semble pas passer par les gènes qui synthétisent les miARN et est bien spécifique, puisque nous avons montré que la mesure d'un autre miARN, miR-144 ne variait pas.

Séparemment ces trois miARN sont capables de diminuer l'activité de NF-κB et la sécrétion en IL-8. Seul miR-636 semble diminuer la sécrétion en IL-6. En combinaison, ces miARN à la concentration finale de 30 nM n'entraînent pas d'effet amplifié.

IV. Article : *miR-636, a newly-identified actor for the regulation of pulmonary inflammation in cystic fibrosis*

Cet article est soumis dans *Frontiers in Immunology*.

1. Contexte de l'étude

La dégradation pulmonaire due à une inflammation exacerbée est la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose (CF). Elle est causée par une mutation du gène *CFTR* qui code un canal chlorure. L'absence ou l'activité diminuée de celui-ci à la membrane apicale des cellules épithéliales conduit à un déséquilibre ionique et un épaississement du mucus. L'hyperviscosité qui en résulte favorise la colonisation bactérienne et la mise en place de cycles infection/inflammation qui dégradent à long terme l'épithélium pulmonaire. L'inflammation bronchique est un stade précoce, prolongé et grave du développement de la mucoviscidose. C'est un point clé de la pathologie, caractérisée par une invasion massive de PNN sur le site inflammatoire en raison d'une chémoattraction par l'IL-8. L'IL-8 est produite par des cellules épithéliales bronchiques suite à une stimulation par une bactérie, un facteur de nécrose tumorale α (TNF-α) ou l'interleukine-1β (IL-1β) par l'activaiton des voies de signalisation comme NF-κB, par les récepteurs de l'IL-1 (IL1R1) ou la sous-famille de récepteurs du TNF (TNFRSF11A ou RANK). L'IL-1β peut aussi activer une autre cible, *FAM13A* (*FAMily with sequence similarity 13 member A*) un gène modificateur de la mucoviscidose qui favorise la transition épithélio-mésenchymateuse et donc le remodelage de l'épithélium des cellules CF. Dans un *small RNAseq* publié précédemment nous avions montré une dérégulation de l'expression de miR-636 chez les patients CF par rapport aux sujets sains. Dans ce nouvel article, nous nous sommes intéressés au rôle de miR-636 sur la régulation de l'inflammation chez les patients CF.

2. Résultats

Notre étude a permis de valider les résultats retrouvés dans le *small RNAseq* de 2018, à savoir une surexpression de miR-636 dans des cellules épithéliales bronchiques cultivées en interface air-liquide issues de patients CF par rapport à des sujets sains (figure 1, A). Nous n'avons pas observé de différence significative concernant les expressions d'*IL1R1*, de *RANK* et d'*IKBKB* au niveau des expressions en ARNm dans ces mêmes cultures (figure 1, B-D), tout comme cela était le cas aussi dans les résultats du *RNAseq*.

Par une mesure de l'expression des différentes cibles dans des explants bronchiques issus de patients CF et non-CF, nous avons montré qu'il semblait y avoir une augmentation de l'expression de miR-636, que l'expression d'*IL1R1* était significativement diminuée, celles de *RANK*, *IKBKB*, *FAM13A* et *IL-8* étaient significativement augmentées et celle de l'*IL-6* semble être diminuée dans les explants bronchiques des patients CF par rapport aux sujets sains (figure 2).

Pour identifier des cibles spécifiques, nous avons utilisé les bases de prédictions bio-informatiques pour prédire les cibles de miR-636 en lien avec l'inflammation et quatre acteurs sont ressortis : IL1R1, RANK, IKBKB et FAM13A (tableau 1). Nous avons donc focalisé notre étude sur ces quatres potentielles cibles avec une analyse fonctionnelle. Nous avons montré que le miR-636 liait spécifiquement la région 3'-UTR d'*IL1R1*, *RANK*, *IKBKB* mais pas celle de *FAM13A* dans le contexte CF (figure 3). Cette interaction entraîne une diminution de l'expression des protéines ILR1 et IKKβ et tend à augmenter l'expression de la protéine RANK après une surexpression de miR 636 (figure 4). De plus, la surexpression de miR-636 provoque une diminution significative de l'activation de la voie NF-κB, de la sécrétion en IL-8 et IL-6, les paramètres principalement dérégulés dans les VA CF (figure 5).

Nous avons voulu vérifier si les expressions de miR-636, *IL1R1*, *RANK* et d'*IKBKB* pouvaient être modulées par *P. aeruginosa*. Cependant, nous avons montré qu'il n'y avait aucune différence significative entre les deux groupes (figure 6).

Enfin, nous voulions déterminer si ce miARN pouvait servir de biomarqueur chez les patients CF par rapport aux sujets sains. Nous avons montré que le miR-636 pouvait être un potentiel biomarqueur entre les patients CF et les sujets sains non-CF dans les neutrophiles sanguins mais pas dans le plasma (figure 7).

3. Conclusion

Cet article a permis de valider la dérégulation de l'expression de miR-636 chez les patients CF, de mettre en évidence la capacité de ce miARN à cibler et inhiber l'activation de la voie NF-κB *via* IL1R1 et IKKβ et par conséquent les sécrétions en IL-8 et IL-6. Nous avons aussi montré que le miR-636 était un miARN activateur du récepteur RANK dans les cellules CF. En régulant l'une des voies de signalisation majeure de l'inflammation, le miR-636 pourrait représenter une potentielle cible thérapeutique de régulation de ce processus. Cependant malgré le fait que le miR-636 soit surexprimé, la voie NF-κB est toujours hyperactivée, il reste donc indispensable de déterminer la source du blocage de l'action de miR-636 dans la cellule CF.

4. Article

miR-636: a newly-identified actor for the regulation of pulmonary inflammation in cystic fibrosis

Pauline Bardin[1, 2], Tobias Foussignière[2], Nathalie Rousselet[2], Carine Rebeyrol[4], Joanna C. Porter[4], Harriet Corvol[1, 2, 3], Olivier Tabary[1, 2*]

[1] Faculté des Sciences, Sorbonne Université, Paris, France

[2] Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris, France

[3] Département de Pédiatrie Respiratoire, Hôpital Trousseau, AP-HP, Paris, France

[4] UCL Respiratory, University College London, Hospitals NHS Foundation Trust, London, United Kingdom

* Correspondence: Olivier Tabary, INSERM UMRS_938, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Hôpital Saint-Antoine, Paris, France. E-mail: olivier.tabary@inserm.fr

Word Count: 4,795

Tables and Figures: 10

Running Title: MicroRNA in cystic fibrosis

Article format: British English

Keywords: inflammation, airway, cystic fibrosis, miRNA, IL1R1, RANK, IKKβ

Abstract

Cystic fibrosis (CF) results from deficient cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein activity leading to defective epithelial ion transport. Pulmonary degradation due to excessive inflammation is the main cause of morbidity and mortality in CF patients. By analysing miRNA (small RNAseq) in human primary air-liquid interface cultures, we measured overexpression of miR-636 in CF patients compared to non-CF. We validated these results in explant biopsies and determined that the mechanism underlying miR-636 overexpression is linked to inflammation. To identify specific targets, we used bioinformatics analysis to predict whether miR-636 targets the 3'-UTR mRNA regions of *IL1R1* and *RANK* (two pro-inflammatory cytokine receptors), IKKβ (a major protein in the NF-κB pathway), and *FAM13A* (a modifier gene of CF lung phenotype implicated in epithelial remodelling). Using bronchial epithelial cells from CF patients to conduct a functional analysis, we showed a direct interaction between miR-636 and *IL1R1*, *RANK*, and *IKBKB*, but not with *FAM13A*. These interactions led to a decrease in IL1R1 and IKKβ protein expression levels, while we observed an increase in RANK protein expression levels following the overexpression of miR-636. Moreover, NF-κB activity and IL-8 and IL-6 secretions decreased following the transfection of miR-636 mimics in CF cells. Similar but opposite effects were found after transfection with an antagomiR-636 in the same cells. Furthermore, we demonstrated that miR-636 was not regulated by *Pseudomonas aeruginosa* in our model. We went on to show that this is raised in blood neutrophils, but not in plasma, of CF patients and may have potential as a novel biomarker. Collectively, our findings reveal a novel actor on inflammation in CF—miR-636—which is able to reduce constitutive NF-κB pathway activation when it is overexpressed.

Introduction

Pulmonary degradation due to excessive inflammation is the main cause of morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF) patients. CF is caused by a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutation which encodes a chloride channel (1). Compromised activity of this channel at the apical membrane of bronchial epithelial cells leads to an ionic imbalance and thickened mucus (2). The resulting mucosal hyperviscosity promotes bacterial colonization, notably by *Pseudomonas aeruginosa*, and establishes infection/inflammation cycles, resulting in the degradation of the pulmonary epithelium (3). Bronchial inflammation occurs at an early stage and contributes to the prolonged development of severe CF disease. This inflammation is a key point in the evolution of CF pathology, which is characterized by a massive polymorphonuclear neutrophil (PMN) invasion at the inflammatory site due to an IL-8 chemo-attraction secreted by pulmonary epithelial cells (4). PMNs, the overproduction of elastase, and IL-8 hypersecretion in the airway are the inflammatory hallmarks of CF lung disease (5, 6). IL-8 secretion is constitutively induced by bronchial epithelial cells and also stimulated by bacterial lipopolysaccharides, tumour necrosis factor-α (TNF-α), or interleukin-1β (IL-1β) through the activation of signaling pathways such as NF-κB by the receptors interleukin 1 receptor 1 (IL1R1) (7-10) or TNF receptor sub-family 11A (TNFRSF11A, also called RANK). The receptor activator of nuclear factor κB ligand (RANKL) and its receptor RANK are part of the tumour necrosis factor (TNF) and TNF receptor families, respectively, TNFSF11, RANK, and TNFRSF11B (11). Additionally, IL-1β is able to activate another target—*FAM13A* (FAMily with sequence similarity 13 member A), a modifier gene of CF. FAM13A promotes epithelial-mesenchymal transition and consequently remodelling in CF epithelial cells compared to the cells of healthy subjects (12). Despite these discoveries, the origin of hyperinflammation in CF is not well understood, although microRNAs (miRNAs) are suspected to be involved.

miRNAs are small endogenous non-coding single-stranded RNA molecules that negatively regulate gene expression. A miRNA can act on the 3'-UTR (untranslated region) of mRNA, leading to its inhibition or degradation (13). Moreover, miRNAs regulate more than 60% of human protein-coding genes, affecting many physiological functions (14). For this reason, miRNAs play a critical role in many diseases characterized by the dysregulation of their expression. Certain studies have focused on the role of miRNA in regulating *CFTR* gene expression (15, 16) and others on the regulation of inflammatory processes (17). The role of miR-199a-3p in the negative regulation of NF-κB pathway activation through IKKβ has been examined previously (18).

In this study, we aimed to understand the role of miR-636, a miRNA we found dysregulated in the context of CF (18), on the regulation of inflammation in CF patients. We assessed miRNA and mRNA expression in air-liquid interface (ALI) cell cultures and in bronchial samples from CF patients and non-CF healthy subjects. We also performed an experimental *in vitro* modulation of miR-636 expression to elucidate the regulation of four different targets (IL1R1, RANK, IKKβ, and FAM13A), determined by bioinformatics analysis and confirmed by functional analysis, in the context of CF. Finally, we determined a potential role for miR-636 neutrophil and plasma biomarker of inflammation CF patients.

Materials and Methods

1) Human bronchial epithelial cell culture

The human bronchial epithelial cell line CFBE41o- (CF) was a gift from Prof. DC Gruenert (UCSF, San Francisco, CA, USA). Cells were cultured in minimum essential medium (MEM) in the presence of Earle's salts and L-glutamine (Thermo Fisher Scientific, Villebon-Sur-Yvette, France) containing 10% bovine growth serum (Eurobio, Les Ulis, France) and 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Cell cultures were grown and maintained at 37°C in a 5% CO_2 humidified incubator. All cells were tested for mycoplasma contamination (Lonza, Ambroise, France).

Human bronchial epithelial cells isolated from bronchial biopsies from five CF (F508del/F508del) patients and non-CF healthy donors were purchased from Epithelix SARL (Geneva, Switzerland) (19). The cells were fully differentiated in air-liquid interface (ALI) cultures (MucilAir™) according to the provider's recommendations.

2) Human lung explants, plasma, and neutrophils

Human lung explants provided by Dr. S. Blouquit-Laye (UVSQ, Versailles, France) were collected and processed in compliance with the standard guidelines for human research (Declaration of Helsinki) and with current French public health legislation (L.1235-2 and L.1245.2 articles, http://www.legifrance.gouv.fr). Each participating institution informed patients and ensured that they were not opposed to the use of surgical samples, removed during a medical act, for research purposes, and written informed consent was obtained from the participants of this study. Lung fragments were obtained from fourteen non-CF controls undergoing surgery (45 ± 21 years old) and from sixteen CF patients (F508del/F508del; 35 ± 9 years old) undergoing lung transplantation. For non-CF controls, samples were obtained from a non-pathological area without inflammatory cells from patients with bronchial carcinoma. After tissue dissection, samples were frozen immediately in liquid nitrogen before miRNA/RNA extraction.

Plasma samples were collected after obtaining an informed consent from each patient included in the study, during annual blood tests from eighteen non-CF controls (30 ± 13 years old) and seventeen CF patients (F508del/F508del; 15 ± 3 years old). The blood samples were centrifuged for 15 min at 3000 *g*. The plasma (supernatant) was harvested, aliquoted, and stored at –80°C until miRNA extraction.

Blood was collected from eight non-CF controls (31 ± 6 years old) and six CF patients (F508del/F508del; 12 ± 2 years old) at UCLH NHS Trust, London, UK. Neutrophils were isolated by Percoll density centrifugation from sodium citrate anticoagulated blood, before aliquoting and storage at – 80°C. Ethical approval was given by the UK National Research Ethics Committee (13/LO/0900) and a material transfer agreement in place.

3) Predicted miRNA target

The role of miR-636 in the regulation of protein expression was examined using a computational approach that predicted the 3'-UTRs of *IL1R1*, *RANK*, *IKBKB*, and *FAM13A* mRNA to contain seed regions that are recognized by a variety of miRNA including miR-636 (Table 1). We used several online algorithms: miRWalk (http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/), miRanda (http://www.microrna.org), RNA22 (https://cm.jefferson.edu/rna22/Interactive/), and Targetscan (http://targetscan.org). The NCBI (https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pubmed?holding=ifrinsblib) and e!Ensembl genome browsers (http://www.ensembl.org/index.html) provided information on the human *IL1R1*, *RANK*, *IKBKB*, and *FAM13A* transcripts and miRBase (http://www.mirbase.org) provided information on miR-636.

4) Cell transfection

CFBE41o- cell lines were transfected with miR-636 mimic (mirVana® miRNA mimic), mimic control (mirVana® miRNA mimic control), antagomiR-636 (mirVana® miRNA inhibitor), or antagomiR control (mirVana® miRNA inhibitor control) (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) using HiPerFect® (30 nM; Qiagen, Les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions. The mature miR-636 sequence is 5'-UGUGCUUGCUCGUCCCGCCCGCA-3'. Forty-eight hours after transfection, the supernatants were recovered and the cells were lysed for miRNA, RNA, and protein extractions.

5) Infection

CFBE41o- cell lines were stimulated with PAK, a strain of *Pseudomonas aeruginosa* heat-killed, at a 0.25 multiplicity of infection (MOI) or without (control condition) during 24 h. The strain was heated at 65°C in a water bath for 15 min to kill the bacteria without altering the virulence factors (e.g., LPS and flagellin), thus allowing the bacteria to infect our cells for longer periods of time, i.e., 24 h. Twenty-four hours after the stimulation, the supernatants were recovered and the cells were lysed for miRNA and RNA extractions

6) RNA and miRNA extraction and RT-qPCR analysis

For miRNA and RNA extraction from human lung explants, 100 mg of pulmonary tissue sample was crushed with a POLYTRON® sonde (PT 3 100; Kinematica, Luzern, Switzerland) in 1 ml of TRIzol® (Life Technologies, Saint-Aubin, France) (20).

miRNA and RNA were extracted from cells using a Nucleospin miRNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). For plasma and neutrophil samples, miRNA was extracted using a Nucleospin miRNA Plasma kit (Macherey-Nagel). RNA and miRNA were eluted with 30 µL of sterile RNase-free water. The concentration and quality of the RNA and miRNA were evaluated using a DS-11 Series Spectrophotometer (DeNovix, Wilmington, DE, USA) based on absorbance at 260 nm.

miR-636, miR-103, miR-16-5p, and *RNU6B* were reverse-transcribed with a TaqMan™ MicroRNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) using 20 ng of miRNA. *IL1R1*, *RANK*, *IKBKB*, *FAM13*, *IL-8*, *IL-6* and *GAPDH* were reverse-transcribed with a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) using 1 µg of RNA. qPCR was performed using an ABI StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific) and TaqMan™ technology. For relative quantification, miRNA and RNA levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and normalized to the expression levels of *RNU6B*, miR-103, miR-16-5p, and *GAPDH.* Each sample was assessed in triplicate.

7) Luciferase assay

For the luciferase assay, we used an *IL1R1*-3'-UTR wild-type (WT), *RANK*-3'-UTR WT, *IKBKB*-3'-UTR WT, and *FAM13A*-3'-UTR WT plasmid: <u>CGCCCCCCTG</u> and mutated plasmid: <u>GCGGGAGAC</u> for all of the targets except for FAM13A (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France). CF cells were seeded in six-well plates and transfected the next day with 1 µg/mL of each plasmid using an ExGen 500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Cells were co-transfected with 30 nM miR-636 or a mimic control. Supernatants were collected 48 h after co-transfection. For these experiments, we used a Secrete-Pair™ Dual Luminescence Assay Kit (Genecopoeia, Tebu-bio, Rockville, MD, USA) designed to analyse the activities of Gaussia luciferase and secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP), as well as an endogenous reporter using the same samples from the cell culture medium.

8) Protein extraction and western blot analysis

Proteins were extracted using a lysing solution (RIPA, anti-protease cocktail). Total protein concentration was evaluated with a Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

Next, 20 µg of total protein extract was reduced and size-separated on 10% SDS-polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose or PVDF membranes (Invitrogen, Paris, France), blocked in TBS-T milk and incubated with specific primary antibodies against IL1R1 (# HPA005823 at 1:500), RANK (# PA80145 at 1:1000), IKKβ (# 2884 at 1:1000), and β-actin (# 3700 at 1:10 000) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). The proteins of interest were detected, imaged, and quantified (Chemidoc; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

9) NF-κB activity

Nuclear proteins were extracted from cells transfected with miR-636 mimic, mimic control, antagomiR-636, or antagomiR control using a nuclear extract kit (Active Motif, Rixensart, Belgium). Total protein concentration was evaluated with a Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific). The transcriptional activity of p65 NF-κB in 20 µg of nuclear protein extract from CFBE41o- cells was assayed using a TransAM™ Transcription Factor Assay Kit (Active Motif).

10) IL-8 and IL-6 assay (ELISA)

The supernatants of cells transfected with miR-636 mimic, mimic control, antagomiR-636, or antagomiR control were recovered 48 h after transfection. IL-8 and IL-6 were quantified in each sample with the human IL-8 Duo-Set kit or human IL-6 Duo-Set kit (R&D Systems, Lille, France).

11) Statistical analysis

All data are described as mean ± SEM. Between-group differences were assessed using the Mann-Whitney *U*-test and Student's *t*-test. An unpaired Student's *t*-test with Welch's correction was applied when the variances were not equal. In the figures, statistically significant differences with $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), and $p \leq 0.0001$ (****).

Results

1) Expression of miR-636, IL1R1, RANK, and IKKβ in CF and non-CF ALI cell cultures

In our previous work, miR-636 expression was found to be significantly overexpressed in CF ALI cell cultures compared to non-CF cultures (18). Small RNAseq raw data files are available in the European Nucleotide Archive (ENA) (primary accession number ERP116236; http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/ERP116236).

In order to validate the expression patterns obtained from small RNAseq and RNAseq, we conducted RT-qPCR on the samples to confirm expression of miR-636 and the mRNA targets (*IL1R1*, *RANK*, and *IKBKB*. We observed a significant increase in miR-636 expression but no significant differences in IL1R1, RANK, and IKKβ mRNA expression in the CF ALI cell cultures compared to the non-CF (Figure 1). These results validate those previously published for the small RNAseq (18).

2) Expression levels of miR-636, *IL1R1, RANK, IKBKB, FAM13A, Il-8* and *IL-6* in CF and non-CF bronchial tissues

To characterize and confirm the relevance of the chosen targets in an *ex vivo* model, we quantified the expression levels of miR-636, *IL1R1*, *RANK*, *IKBKB*, and *FAM13A* and the two secreted cytokines, *IL-8* and *IL-6*, in human lung explants from CF patients and non-CF control biopsies using RT-qPCR.

In CF bronchial tissues, we observed that all of the measured mRNA and miRNA targets were more heterogeneously expressed, due to inter-individual phenotypic variability, than in non-CF bronchial tissues (Figure 2). In CF patients, miR-636 appears to be overexpressed (Figure 2, A); *IL1R1* mRNA levels were significantly lower (Figure 2, B) and *RANK*, *IKBKB*, *FAM13A*, and *IL-8* mRNA levels were significantly higher (Figure 2, C-F), while *IL-6* mRNA seemed to be decreased (Figure 2, G) compared to non-CF controls.

3) miR-636 directly regulates *IL1R1, RANK*, and *IKBKB* expression levels but not *FAM13A*

In CF patients, we hypothesized that miR-636 is able to act on the four predicted targets, thereby influencing pulmonary inflammation. The CF cells were transfected with miR-636 at different concentrations (10, 30, 60, and 100 nM) or with mimic controls and cultured for 48 h (Figure S1, A). miR-636 expression was analysed by RT-qPCR. The level of miR-636 in the presence of 30 nM of the mimic during 48 h increased by a factor of 10 000 compared to the control (Figure S1, B). We also showed that levels of endogenous miR-636 decreased by a factor of 40%, in the presence of 30 nM of antagomiR-636 compared to that in the antagomiR control (Figure S1, C). Having established these optimal conditions, subsequent experiments were performed with 30 nM of miR-636 mimic and/or antagomiR.

To establish whether miR-636 modulates *IL1R1*, *RANK*, *IKBKB*, or *FAM13* expression levels by binding to their 3'-UTRs, CF cells were co-transfected with a luciferase reporter vector containing the 3'-UTR region of WT mRNA (WT-IL1R1-3'UTR; WT-RANK-3'-UTR; WT-IKBKB-3'-UTR; and WT-FAM13A-3'-UTR) or with the 3'-UTR mutated region of each target except *FAM13A* (M-IL1R1-3'UTR; M-RANK-3'-UTR; and M-IKBKB-3'-UTR) and with the miR-636 mimic or mimic control. After 48 h, transfection with the mimic induced stronger miR-636 expression than did the control (Figure S1, B). We observed a significant decrease in luciferase activity after co-transfection with the miR-636 mimic/WT-IL1R1-3'UTR compared to the mimic control/WT-IL1R1-3'UTR (Figure 3, A); furthermore, this decrease was more significant compared to that of the miR-636 mimic/M-IL1R1-3'UTR (Figure 3, B). We observed the same results for *RANK* (Figure 3, C, D) and *IKBKB* (Figure 3, E-F). However, we observed no variation after 48 h of transfection with the miR-636 mimic/WT-FAM13A-3'-UTR compared to the mimic control/WT-FAM13A-3'-UTR (Figure 3, G).

These experiments confirm that miR-636 directly interacts with the 3'-UTR region of *IL1R1*, *RANK*, and *IKBKB*, but not with *FAM13A*.

4) miR-636 represses IL1R1 and IKKβ protein expression and increases RANK protein expression in CF cells

Under the same conditions described above, we assessed the protein expression of IL1R1, RANK, and IKKβ (not FAM13A, given that it is not regulated by miR-636) (Figure 4, A). In the presence of the miR-636 mimic in CF cells, we observed that IL1R1 protein expression was significantly lower by 33% than in the presence of the mimic control (Figure 4, B). We also observed that the antagomiR-636 does not alter IL1R1 protein expression variation compared to the antagomiR control condition (Figure 4, C). In the presence of the miR-636 mimic in CF cells, we observed that RANK protein expression was significantly higher by 35% than in the mimic control (Figure 4, D). Furthermore, antogomiR-636 seemed to decrease RANK protein expression by 20% compared to the antagomiR control (Figure 4, E). In the presence of the miR-636 mimic in CF cells, we observed that IKKβ protein expression was significantly lower by 22% than in the mimic control (Figure 4, F). Moreover, the antagomiR-636 seemed to increase IKKβ protein expression by a factor 2 compared to the antagomiR control (Figure 4, G). We thereby confirmed that overexpression of miR-636 in CF bronchial epithelial cells leads to a reduction in IL1R1 and IKKβ, but an increase in RANK protein expression.

5) miR-636 regulates NF-κB pathway activation and IL-8 and IL-6 secretions

Next, we evaluated the effect of miR-636 on NF-κB activity in the nucleus using the TransAM® method (18). From CF cells transfected with the miR-636 mimic or control and with antagomiR-636 or antagomiR control, we extracted nuclear proteins after 48 h of transfection. NF-κB activity was assessed from the protein extracts through a colorimetric reaction, proportional to NF-κB activity. We observed that the miR-636 mimic significantly decreased NF-κB activity by 38% in CF cells compared to the mimic control (Figure 5, A), whereas antagomiR-636 failed to impact NF-κB activity (Figure 5, B).

The IL-8 and IL-6 secretions measured by ELISA showed that the miR-636 mimic decreased the secretion of both proteins compared to the mimic control in CF cells (Figure 5, C and E). After 48 h, transfection with antagomiR-636 there was no variation in IL-8 and IL-6 secretions compared to the antagomiR control (Figure 5, D and F). These experiments demonstrated that NF-κB activity, and IL-8 and IL-6 protein expression are reduced following overexpression of miR-636.

6) miR-636 expression is not modulated by *P. aeruginosa*

In the airways of CF adult patients, the most common pathogen found is *P. aeruginosa*. We were therefore interested in the possible impact of stimulation by this bacterium on the expression of miR-636. CF cells were stimulated with, or without (control) a PAK strain of *P. aeruginosa* at an MOI of 0.25 heat-killed for 24 h.

We observed that stimulation by the strain PAK MOI 0.25 heat-killed during 24 h led to no change in *IL1R1*, *RANK*, *IKBKB* mRNA, nor miR-636 (Figure 6, A-D). Surprisingly we therefore demonstrated that miR-636 expression is not modulated by *P. aeruginosa* in CF bronchial epithelial cells.

7) Expression of miR-636 in CF and non-CF plasma and neutrophils

In order to analyse the association between inflammation and miR-636 expression in the plasma of CF patients, we used RT-qPCR to measure the levels of this miRNA in non-CF and CF patient plasma extracts. We found no significant differential expression of miR-636 in CF plasma patients compared to non-CF plasma controls (Figure 7, A). However, when we measured the miR-636 levels in non-CF and CF neutrophils, we found a significant increase in miR-636 expression in CF neutrophils compared to non-CF neutrophils (Figure 7, B).

Discussion

In this work, we show for the first time that miR-636 is able to target key players in the inflammatory cascade and may play a significant role in modulating the inflammatory processes in CF. We have demonstrated by functional analysis that this miRNA could modify IL1R1, RANK, and IKKβ expression by a direct interaction on the 3'-UTR mRNA regions. The first articles reporting the dysregulation of miR-636 expression were published in 2011 (21, 22). In most studies from 2011 to the present day, to the best of our knowledge only the observation of miR-636 expression dysregulation in various pathological contexts has been identified: myelodysplastic syndrome (21), osteoporosis fractures (23), aortic stenosis (24), dilated cardiomyopathy (25), colorectal tumour (26), colon adenocarcinoma (27), urothelial carcinoma of chronic haemodialysis patients (28), diabetic nephropathy (29), and breast cancer (30), but nothing related to cystic fibrosis. Furthermore, in only one has the direct link between this miRNA and one of the predicted targets at the 3'-UTR region of GRα has been reported (22). Thus, its expression is associated with various cellular processes such as the survival, proliferation, inflammation, and repair of DNA.

To identify specific miR-636 targets related to inflammation, we used bioinformatics prediction *in silico* databases that highlighted four actors: IL1R1, RANK, IKKβ, and FAM13A. We, therefore, focused our study on these four potential targets using functional analysis. In the CF context, we showed that miR-636 specifically binds to the 3'-UTR regions of *IL1R1*, *RANK*, and *IKBKB*, but not *FAM13A* mRNA. The miRNA interactions led to a decrease in the expression of ILR1 and IKKβ proteins and to an increase in the expression of RANK protein following overexpression of miR-636. Moreover, the overexpression of miR-636 causes a significant decrease in the activation of the NF-κB pathway, and in the secretion of IL-8 and IL-6—parameters that are well known to be dysregulated in CF airways (5, 31).

Our study consolidates the results we previously obtained in the small RNAseq experiments of 2018 (18). In fact, we showed overexpression of miR-636 in bronchial epithelial cells from CF patients cultured at ALI compared to healthy subjects. We did not observe a significant difference in *IL1R1*, *RANK*, and *IKBKB* mRNA expression in these same cultures, as was the case in the RNAseq results. This is likely due to the fact that it is the protein and not the mRNA expression that is dysregulated by miRNAs in most case. By measuring the expression levels of different targets in bronchial explants from CF and non-CF patients, we showed an increase of miR-636 expression, a significant decrease in *IL1R1* expression, significant increases in *RANK*, *IKBKB*, *FAM13A*, and *IL-8* expression levels, and *IL-6* mRNA expression appears decreased in bronchial explants of CF patients compared to healthy subjects.

As for many miRNAs, the origin of the dysregulation of miR-636 expression in the CF context is not known and remains to be identified. In another pathological context, a link has been established with ANT2 (adenine nucleotide translocator 2) (32). ANT2—a mitochondrial carrier family 25 member 5—contributes to the translocation of ADP from the cytoplasm to the mitochondrial matrix and to ATP inversely. The suppression of this gene has been shown to induce apoptosis and inhibit tumour growth. Indeed, a decrease in miR-636 expression is associated with cell proliferation via an increase in Ras expression, one of the putative targets of this miRNA. In addition, the suppression of ANT2 restores the expression of miR-636, thus making it possible to reduce the expression of Ras and to inhibit cell proliferation (32) through the PI3K/Akt pathway (33). A decrease in miR-636 is also involved in the recovery from heart failure due to dilated cardiomyopathy (25). Furthermore, in human endothelial cell progenitors, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is able to increase miR-636 expression (34). Interestingly, miR-636 manifests other biological effects; for instance, circulating miR-636 is involved in the elimination of hepatitis C virus (HCV) and also in liver regeneration. miR-636 may provide a potential therapy in HCV patients with persistent infection despite antiviral treatment (35). Another hypothesis involving miR-636 dysregulation is the modulation of miRNA gene methylation. In fact, a study of miRNA methylation showed that in the context of a weight-loss diet, miR-636 is hypomethylated and overexpressed in the white blood cells of high-responder patients (36). Further investigations are needed to understand the origin of miR-636 dysregulation in the context of CF and the link with CFTR deficiency.

To understand the implication of miRNAs in the inflammatory process, only two articles have focused on the regulation by miRNA of IL-8 secretion in CF (37, 38). These articles have demonstrated that miR-93 and miR-17 are implicated in this regulation, but publications are too limited to understand all the system. For example, different proteins involved in the regulation of IL-8 network could be concerned NF-κB pathway as IκBα, or the IκB kinases (IKK). In this way, we have recently shown that miR-199a-3p decreases the expression of IKKβ by direct interaction, hence the activation of the NF-κB pathway and the secretion of IL-8 (18).

Recently, others have demonstrated that overexpression of miR-199b decreases the expression of IKKβ-NF-κB, TNF-α, and IL-1β in acute spinal cord injury (39). However, miR-199b is an isoform with a mature sequence identical to miR-199a-3p (40). Here, we showed similar results between the overexpression of miR-636 and the increase of IL-8 secretion levels even if the target is different.

In our study, we have demonstrated the direct interaction between miR-636 and *IL1R1*, *RANK* and *IKBKB*, that lead to an indirect effect on IL-8 secretion. Even if the link is evident between IKBKB and IL-8 through NF-κB pathway, IL1R1 and RANK are proteins that have been shown to be involved in other inflammation-related diseases. For example, IL1R1 shares downstream targets common to TLR4 (toll-like receptor 4) (41).

TLR4 plays a pivotal role in innate immunity in its activation of inflammatory signaling pathways (42) in response to various pathogens including viruses, bacteria, and fungi (43). Given that the TLR4 pathway is also dysregulated in the context of CF (6, 44), it would be interesting to determine the impact of miR-636 overexpression. Overexpression of miR-636 inhibiting IL1R1 expression could downregulate the TLR4 signaling pathway with importance and not just in CF but in other diseases, such as epilepsy, in which inactivation of IL1R1/TLR4 pathway is implicated (45). Activation of TLR4 prevents the translocation of IRF3 (interferon regulatory factor 3) and thus the synthesis of genes such as *IFN1*, required for dendritic cell activation and clearance of CF pathogens (6). The *IL1R1* gene that encodes the receptor whose activation occurs by binding a specific ligand brings about the activation of the NF-κB pathway, which is widely known as a modulator of the expression of inflammatory and immune genes as IL-8 (46, 47, 31, 48). It has also been shown that TLR4-activated NF-κB rapidly increases the expression of miR-9 that fine-tunes NF-κB-dependent responses (49). Altogether, these data reveal that the regulation of proteins is highly complex with numerous parameters not yet elucidated. Such regulation is tightly controlled by transcription factors and also miRNA.

For the third target, we have identified TNF-α activates inflammatory pathways by binding to TNF receptors such as TNFRSF11A, also called RANK, in the context of CF. We have shown that miR-636 specifically binds to *RANK* at its 3'-UTR region and thus regulates its protein expression. RANK acts as an essential regulator in osteoclastogenesis (50, 51), but also controls the organogenesis of lymph nodes (50), intestinal development (52), thymic medullary epithelial cells (53), and function of the mammary glands during pregnancy (54). More RANK system has been described in the direct regulation of IL-8 in B chronic lymphocytic leukemia cells (55). Furthermore, one study also reported its involvement in lung cancer cells (11), illustrating its role in the lung. Our study identified differentially enhanced expression of RANK in the bronchial explants of CF patients and the regulation of its protein expression by miR-636 in CF cells. These results for the first time suggest the direct regulation of RANK at the pulmonary level by a miRNA.

As our results demonstrate, overexpression of miR-636 leads to a significant decrease in NF-κB pathway activation in CF epithelial cells. We previously identified the overexpression of miR-636 in small RNAseq, but the NF-κB pathway is hyper-activated in the context of CF. Also, we hypothesize the existence of a long non-coding RNA (lncRNA) in the cell that could block the action of miR-636 on these different targets and could act as a miRNA sponges –containing several miRNA binding sequences– as previously described (17). We will use a database to predict the interaction between miRNA and lncRNA (56) to determine, in the context of CF, which lncRNA is overexpressed and able to block the expression of miR-636. A more thorough understanding of miR-636 will allow us to consider this miRNA as a possible therapeutic target to reduce the inflammation in CF patients.
We also showed in our cell model, that infection with heat-killed *Pseudomonas aeruginosa*, the pathogen most commonly found in the airways of CF patients, at an MOI of 0.25 for 24 h, had no effect on levels of miR-636, *IL1R1*, *RANK*, and *IKBKB* expression levels. We chose a protracted-time interval to assess the possible impact on the expression of our miRNA, but it is possible that it was too long to observe a significant impact on the expression levels in mRNA. Future studies should consider examining the protein expression levels of IL1R1, RANK, and IKKβ to identify the potential effects of infectious stimulation.

Our results suggest that miR-636 can be considered a biomarker of inflammation in the blood neutrophils of CF patients but not in plasma. For example, in combination with other miRNAs (miR-150, miR-145, and miR-223), miR-636 could serve as a biomarker in the blood as shown previously (57) and as a biomarker of renal pathology associated with diabetes, in that miR-636 is expressed in exosomes present in the urine of patients (58). It would be interesting to assess the expression levels of miR-150, miR-145, and miR-223 in plasma in addition to miR-636 expression. In the prostate context, the decreased expression of miR-636 makes be a predictive biomarker (59). We have shown that the expression of miR-636 appeared to be higher in the plasma of CF patients and was significantly elevated in the blood neutrophils of CF patients compared to healthy subjects. It is likely that in combination with other miRNAs, miR-636 can serve as a biomarker of inflammation in CF patients as previously shown in plasma (57, 60) and neutrophils (61).

In addition to basic science implications, our data might be of interest in applied biomedicine because we demonstrate that miR-636 is strongly implicated in IL-8 secretion in CF context through new identify targets as IL1R1, RANK, and IKKβ. Our results highlight miR-636 as a potential candidate for more in-depth drug development studies to limit IL-8 secretion and chronic neutrophilic lung diseases in CF airways. More, miR-636 present in the neutrophils of CF patients could serve as potential biomarker for detecting early-stage of CF airways inflammation.

Conflict of Interest

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.

Author Contributions

PB performed and designed the experiments, interpreted results, obtained funding, and wrote the manuscript. TF performed certain experiments. NR and HC interpreted certain results. CR and JCP provided neutrophils. OT performed and designed experiments, interpreted results, obtained funding, and wrote the manuscript. All authors: PB, TF, NR, CR, JCP, HC and OT reviewed the manuscript.

Funding

This research was funded in part by grants from Inserm, Sorbonne Université, Faculté des Sciences, and the non-profit organization Vaincre la Mucoviscidose. PB received a PhD grant from Ministère de la Recherche et de L'enseignement Supérieur, Sorbonne Université. CR was funded by an EU Marie Curie Fellowship and JP by an MRC New Investigator Research Grant.

Acknowledgments

We thank Dr. DC Gruenert who provided the CFBE41o- cells, Dr. S Blouquit-Laye who provided bronchial tissues, Dr. D Debray who provided plasma, and Dr Paul Aurora, Great Ormond Street London for help with patients samples.

References

(1) 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) 245:1066–73. DOI: 10.1126/science.2475911.

(2) Boucher RC. An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. Adv Drug Deliv Rev (2002) 54:1359–71.

(3) Downey DG, Bell SC, and Elborn JS. Neutrophils in cystic fibrosis. Thorax (2009) 64:81–8. DOI: 10.1136/thx.2007.082388.

(4) Dhooghe B, Noel S, Huaux F, and Leal T. Lung inflammation in cystic fibrosis: pathogenesis and novel therapies. Clin Biochem (2014) 47:539–46. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.12.020.

(5) Tabary O, Zahm JM, Hinnrasky J, Couetil JP, Cornillet P, Guenounou M, et al.. Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells *in vivo* and *in vitro*. Am J Pathol (1998) 153:921–30. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65633-7.

(6) Cohen TS and Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. Nat Med (2012) 18:509–19. DOI: 10.1038/nm.2715.

(7) Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulin N, Charron S, Schnyder-Candrian S, et al.. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. J Clin Invest (2007) 117:3786–99. DOI: 10.1172/JCI32285.

(8) Palomo J, Marchiol T, Piotet J, Fauconnier L, Robinet M, Reverchon F, et al.. Role of IL-1beta in experimental cystic fibrosis upon P. aeruginosa infection. PLoS One (2014) 9:e114884. DOI: 10.1371/journal.pone.0114884.

(9) Schreuder H, Tardif C, Trump-Kallmeyer S, Soffientini A, Sarubbi E, Akeson A, et al.. A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist. Nature (1997) 386:194–200. DOI: 10.1038/386194a0.

(10) Weber A, Wasiliew P, and Kracht M. Interleukin-1beta (IL-1beta) processing pathway. Sci Signal (2010) 3:cm2. DOI: 10.1126/scisignal.3105cm2.

(11) Rao S, Sigl V, Wimmer RA, Novatchkova M, Jais A, Wagner G, et al.. RANK rewires energy homeostasis in lung cancer cells and drives primary lung cancer. Genes Dev 31 (2017) 31:2099–2112. DOI: 10.1101/gad.304162.117.

(12) Corvol H, Rousselet N, Thompson KE, Berdah L, Cottin G, Foussigniere T, et al.. FAM13A is a modifier gene of cystic fibrosis lung phenotype regulating rhoa activity, actin cytoskeleton dynamics and epithelial-mesenchymal transition. J Cyst Fibros (2018) 17:190–203. DOI: 10.1016/j.jcf.2017.11.003.

(13) Filipowicz W, Bhattacharyya SN, and Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat Rev Genet 9 (2008) 9:102–14. DOI: 10.1038/nrg2290.

(14) Friedman RC, Farh KK, Burge CB, and Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res (2009) 19:92–105. DOI: 10.1101/gr.082701.108.

(15) Lutful Kabir F, Ambalavanan N, Liu G, Li P, Solomon GM, Lal CV, et al.. MicroRNA-145 Antagonism Reverses TGF-beta Inhibition of F508del CFTR Correction in Airway Epithelia. Am J Respir Crit Care Med (2017) 197:632–643. DOI: 10.1164/rccm.201704-0732OC.

(16) Bartoszewska S, Kamysz W, Jakiela B, Sanak M, Kroliczewski J, Bebok Z, et al.. miR-200b downregulates CFTR during hypoxia in human lung epithelial cells. Cell Mol Biol Lett 22 (2017) 22:23. DOI: 10.1186/s11658-017-0054-0.

(17) Bardin P, Sonneville F, Corvol H, and Tabary O. Emerging microRNA Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. Front Pharmacol (2018) 9:1113. DOI: 10.3389/fphar.2018.01113.

(18) Bardin P, Marchal-Duval E, Sonneville F, Blouquit-Laye S, Rousselet N, Le Rouzic P, et al.. Small RNA and transcriptome sequencing reveal the role of miR-199a-3p in inflammatory processes in cystic fibrosis airways. J Pathol (2018) 245:410–420. DOI: 10.1002/path.5095.

(19) Wiszniewski L, Jornot L, Dudez T, Pagano A, Rochat T, Lacroix JS, et al.. Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from patients with cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol (2006) 34:39–48. DOI: 10.1165/rcmb.2005-0161OC.

(20) Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162 (1987) 162:156–9. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.

(21) Erdogan B, Facey C, Qualtieri J, Tedesco J, Rinker E, Isett RB, et al.. Diagnostic microRNAs in myelodysplastic syndrome. Exp Hematol (2011) 39:915-926 e2. DOI: 10.1016/j.exphem.2011.06.002.

(22) Tessel MA, Benham AL, Krett NL, Rosen ST, and Gunaratne PH. Role for microRNAs in regulating glucocorticoid response and resistance in multiple myeloma. Horm Cancer (2011) 2:182–9. DOI: 10.1007/s12672-011-0072-8.

(23) Garmilla-Ezquerra P, Sanudo C, Delgado-Calle J, Perez-Nunez MI, Sumillera M, and Riancho JA. Analysis of the bone microRNome in osteoporotic fractures. Calcif Tissue Int (2015) 96:30–7. DOI: 10.1007/s00223-014-9935-7.
(24) Shi J, Liu H, Wang H, and Kong X. MicroRNA Expression Signature in Degenerative Aortic Stenosis. Biomed Res Int (2016) 2016:4682172. DOI: 10.1155/2016/4682172.
(25) Miyamoto SD, Karimpour-Fard A, Peterson V, Auerbach SR, Stenmark KR, Stauffer BL, et al.. Circulating microRNA as a biomarker for recovery in pediatric dilated cardiomyopathy. J Heart Lung Transplant (2015) 34:724–33. DOI: 10.1016/j.healun.2015.01.979.
(26) Slattery ML, Herrick JS, Mullany LE, Wolff E, Hoffman MD, Pellatt DF, et al.. Colorectal tumor molecular phenotype and miRNA: expression profiles and prognosis. Mod Pathol (2016) 29:915–27. DOI: 10.1038/modpathol.2016.73.
(27) Yan W, Yang W, Liu Z, and Wu G. Characterization of microRNA expression in primary human colon adenocarcinoma cells (SW480) and their lymph node metastatic derivatives (SW620). Onco Targets Ther (2018) 11:4701–4709. DOI: 10.2147/OTT.S169233.
(28) Chen CL, Lin CH, Li AL, Huang CC, Shen BY, Chiang YR, et al.. Plasma miRNA profile is a biomarker associated with urothelial carcinoma in chronic hemodialysis patients. Am J Physiol Renal Physiol (2019) 316:F1094–F1102.
(29) Wang LP, Gao YZ, Song B, Yu G, Chen H, Zhang ZW, et al.. MicroRNAs in the Progress of Diabetic Nephropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis. Evid Based Complement Alternat Med (2019) 2019:3513179. DOI: 10.1155/2019/3513179.
(30) Encarnacion-Medina J, Ortiz C, Vergne R, Padilla L, and Matta J. MicroRNA Expression Changes in Women with Breast Cancer Stratified by DNA Repair Capacity Levels. J Oncol (2019) 2019:7820275. DOI: 10.1155/2019/3513179.
(31) Tabary O, Escotte S, Yvin JC, Puchelle E, and Jacquot J. Osmolarity of airway surface liquid regulates the IL-8 production of airway epithelial cells through NF-B-kappa transcriptional activity. AJRCCM (1999) 159:A508.
(32) Jang JY, Lee YS, Jeon YK, Lee K, Jang JJ, and Kim CW. ANT2 suppression by shRNA restores miR-636 expression, thereby downregulating Ras and inhibiting tumorigenesis of hepatocellular carcinoma. Exp Mol Med (2013) 45:e3. DOI: 10.1038/emm.2013.1.
(33) Baik SH, Lee J, Lee YS, Jang JY, and Kim CW. ANT2 shRNA downregulates miR-19a and miR-96 through the PI3K/Akt pathway and suppresses tumor growth in hepatocellular carcinoma cells. Exp Mol Med 48 (2016) 48:e222. DOI: 10.1038/emm.2015.126.
(34) He T, Sun R, Li Y, and Katusic ZS. Effects of Brain-Derived Neurotrophic Factor on MicroRNA Expression Profile in Human Endothelial Progenitor Cells. Cell Transplant 27 (2018) 27:1005–1009. DOI: 10.1177/0963689718761658.
(35) Morishita A, Yoneyama H, Iwama H, Fujita K, Watanabe M, Hirose K, et al.. Circulating microRNA-636 is associated with the elimination of hepatitis C virus by ombitasvir/paritaprevir/ritonavir. Oncotarget (2018) 9:32054–32062. DOI: 10.18632/oncotarget.25889.
(36) Garcia-Lacarte M, Martinez JA, Zulet MA, and Milagro FI. Implication of miR-612 and miR-1976 in the regulation of TP53 and CD40 and their relationship in the response to specific weight-loss diets. PLoS One (2018) 13:e0201217. DOI: 10.1371/journal.pone.0201217.
(37) Fabbri E, Borgatti M, Montagner G, Bianchi N, Finotti A, Lampronti I, et al.. Expression of microRNA-93 and Interleukin-8 during Pseudomonas aeruginosa-mediated induction of proinflammatory responses. Am J Respir Cell Mol Biol (2014) 50:1144-55. DOI: 10.1165/rcmb.2013-0160OC
(38) Oglesby IK, Vencken SF, Agrawal R, Gaughan K, Molloy K, higgins G, et al.. MiR-17 overexpression in cystic fibrosis airway epithelial cells decreases interleukin-8 production. Eur Respir J (2015) 46:1350-60. DOI: 10.1183/09031936.00163414.

(39) Zhou HJ, Wang LQ, Xu QS, Fan ZX, Zhu Y, Jiang H, et al.. Downregulation of miR-199b promotes the acute spinal cord injury through IKKbeta-NF-kappaB signaling pathway activating microglial cells. Exp Cell Res (2016) 349:60–67. DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.09.020.
(40) Dabbah M, Attar-Schneider O, Zismanov V, Tartakover Matalon S, Lishner M, and Drucker L. Letter to the Editor: miR-199b-3p and miR-199a-3p are isoforms with identical sequence and established function as tumor and metastasis suppressors. J Leukoc Biol (2017) 101:1069. DOI: 10.1189/jlb.3LT0117-038.
(41) Brown GT, Narayanan P, Li W, Silverstein RL, and McIntyre TM. Lipopolysaccharide stimulates platelets through an IL-1beta autocrine loop. J Immunol (2013) 191:5196–203. DOI: 10.4049/jimmunol.1300354.
(42) Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Maitra S, Das G, Mukhopadhyay S, et al.. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. Nat Med (2012) 18:1279–85. DOI: 10.1038/nm.2851.

(43) Liu Y, Li T, Xu Y, Xu E, Zhou M, Wang B, et al.. Effects of TLR4 gene silencing on the proliferation and apotosis of hepatocarcinoma HEPG2 cells. Oncol Lett (2016) 11:3054–3060. DOI: 10.3892/ol.2016.4338.
(44) Petit-Bertron AF, Tabary O, Corvol H, Jacquot J, Cment A, Cavaillon JM, et al.. Circulating and airway neutrophils in cystic fibrosis display different TLR expression and responsiveness to interleukin-10. Cytokine (2007) 41:54–60. DOI: 10.1016/j.cyto.2007.10.012.
(45) Iori V, Iyer AM, Ravizza T, Beltrame L, Paracchini L, Marchini S, et al. Blockade of the IL-1R1/TLR4 pathway mediates disease-modification therapeutic effects in a model of acquired epilepsy. Neurobiol Dis (2017) 99:12–23. DOI: 10.1016/j.nbd.2016.12.007.
(46) Bonizzi G, and Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. Trends Immunol (2004) 25:280–8. DOI: 10.1016/j.it.2004.03.008.
(47) DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, and Prince A. Activation of NF-kappaB by adherent Pseudomonas aeruginosa in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. J Clin Invest (1998) 101:2598–605. DOI: 10.1172/JCI2865.
(48) Verhaeghe C, Remouchamps C, Hennuy B, Vanderplasschen A, Chariot A, Tabruyn SP, et al.. Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways. Biochem Pharmacol (2007) 73:1982–94. DOI: 10.1016/j.bcp.2007.03.019.
(49) Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D, Mirolo M, Mori L, et al.. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. Proc Natl Acad Sci USA (2009) 106:5282–7. DOI: 10.1073/pnas.0810909106.
(50) Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al.. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature (1999) 397:315–23. DOI: 10.1038/16852.
(51) Velard F, Delion M, Tabary O, Guillaume C, Gangloff S, Le Pimpec-Barthes F, et al.. Bone Disease in Cystic Fibrosis: Expression of Osteocalcin and RANK-L/OPG Ratio in Human Osteoblasts with the f508del Mutation in CFTR. Pediatr Pulmonol (2015) 50:416–416.
(52) Knoop KA, Kumar N, Butler BR, Sakthivel SK, Taylor RT, Nochi T, et al.. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. J Immunol (2009) 183:5738–47. DOI: 10.4049/jimmunol.0901563.
(53) Rossi SW, Kim MY, Leibbrandt A, Parnell SM, Jenkinson WE, Glanville SH, et al.. RANK signals from CD4(+)3(-) inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. J Exp Med (2007) 204:1267–72. DOI: 10.1084/jem.20062497.
(54) Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, et al.. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. Cell (2000) 103:41–50. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)00103-3.
(55) Secchiero P, Corallini F, Barbarotto E, Melloni E, Di Lasio MG, Tiribelli M, et al., Role of the RANKL/RANK system in the induction of interleukin-8 (IL-8) in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. J Cell Physiol (2006) 207:158-164. DOI: 10.1002/jcp.20547.

(56) Furio-Tari P, Tarazona S, Gabaldon T, Enright AJ, and Conesa A. spongeScan: A web for detecting microRNA binding elements in lncRNA sequences. Nucleic Acids Res (2016) 44:W176-80. DOI: 10.1093/nar/gkw443.
(57) Schultz NA, Dehlendorff C, Jensen BV, Bjerregaard JK, Nielsen KR, Bojesen SE, et al.. MicroRNA biomarkers in whole blood for detection of pancreatic cancer. JAMA (2014) 311:392–404. DOI: 10.1001/jama.2013.284664.
(58) Eissa S, Matboli M, Aboushahba R, Bekhet MM, and Soliman Y. Urinary exosomal microRNA panel unravels novel biomarkers for diagnosis of type 2 diabetic kidney disease. J Diabetes Complications (2016) 30:1585–1592. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2016.07.012.
(59) Pashaei E, Pashaei E, Ahmady M, Ozen M, and Aydin N. Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy. PLoS One (2017) 12:e0179543. DOI: 10.1371/journal.pone.0179543.
(60) Cook NL, Pereira TN, Lewindon PJ, Shepherd RW, and Ramm GA. Circulating microRNAs as noninvasive diagnostic biomarkers of liver disease in children with cystic fibrosis. J Pediatr Gastroenterol Nutr (2015) 60:247–54.
(61) Huang Y, Zhang S, Fang X, Qin L, Fan Y, Ding D, et al.. Plasma miR-199a-5p is increased in neutrophilic phenotype asthma patients and negatively correlated with pulmonary function. PLoS One (2018) 13:e0193502. DOI: 10.1371/journal.pone.0193502.

TABLES

Table 1: Summary table of the mRNA predicted to be targeted by miR-636 from different databases.

GENES	EntrezID	REfseqID	miRNA	miRWalk	miRanda	RNA22	Targets can	Sum
IL1R1	3554	XM_005263933	hsa-miR-636	1	1	1	1	4
RANK	8792	NM_003839		1	0	1	1	3
IKBKB	3551	NM_001190720		1	0	0	1	2
FAM13A	10144	NM_014883		1	1	1	1	4

FIGURES

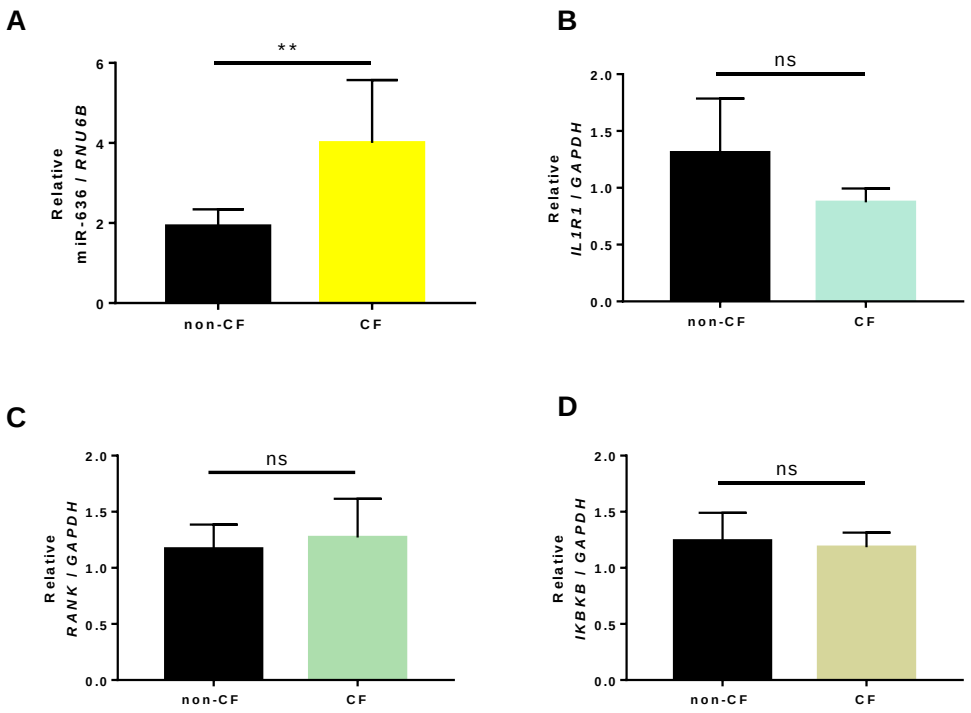


Figure 1: Validation of the results of small RNAseq and RNAseq. Quantification of miR-636 expression (A, n = 5, p = 0.0019), *IL1R1* (B, p = 0.2048), *RANK* (C, p = 0.4274), and *IKBKB* (D, p = 0.3074) in bronchial epithelial cells from CF patients (n = 3) and healthy subjects (non-CF; n = 5) cultured at the air-liquid interface. Student's t-test was used to determine significance.

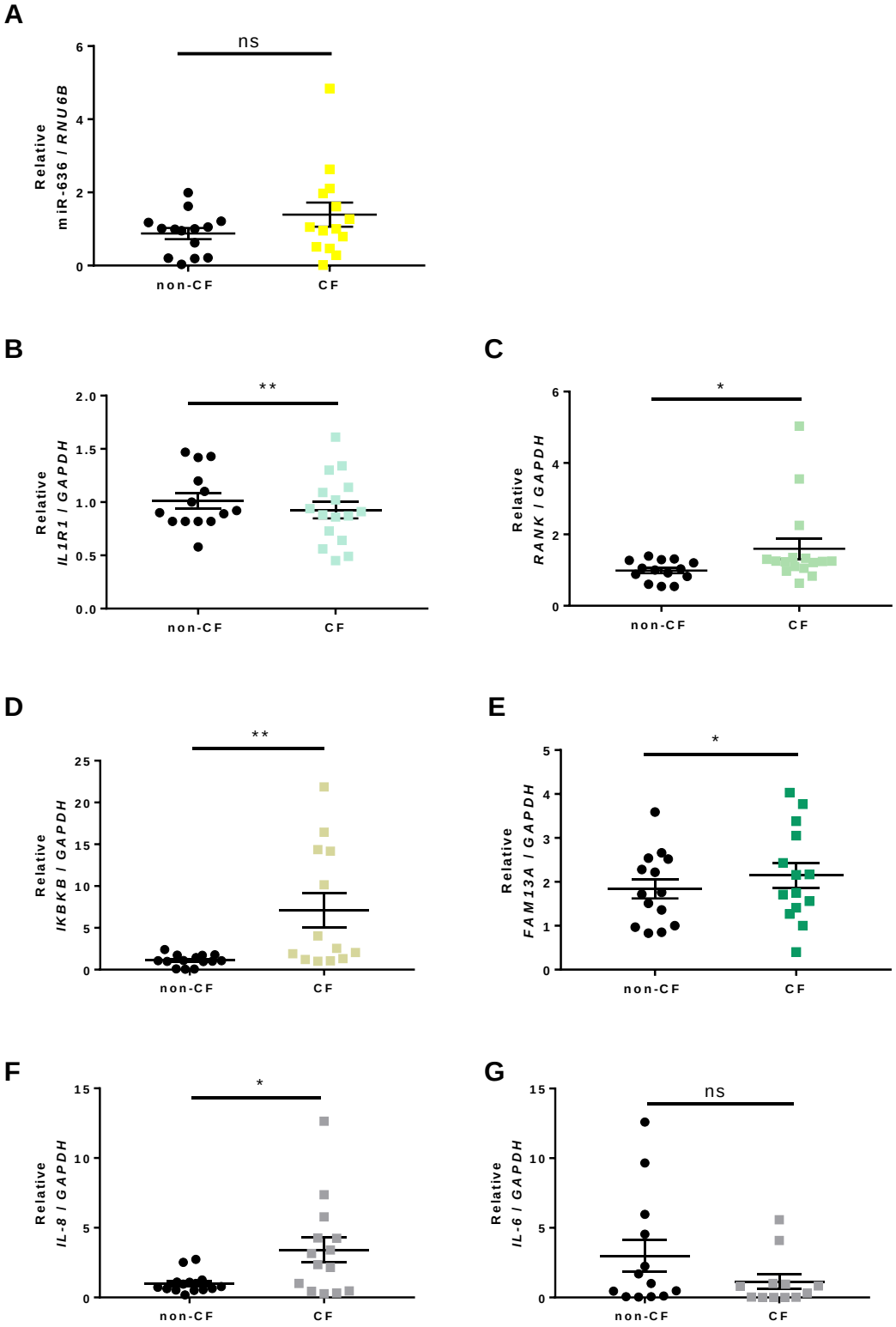


Figure 2: Expression of miR-636, *IL1R1*, *RANK*, *IKBKB*, *FAM13A*, *IL-8*, and *IL-6* in CF and non-CF bronchial explants. Quantification of the expression of miR-636 (A, p = 0.1585), *IL1R1* (B, p = 0.0021), *RANK* (C, p = 0.0187), *IKBKB* (D, p = 0.0053), *FAM13A* (E, p = 0.0119), *IL-8* (F, p = 0.0132), and *IL-6* (G, p = 0.1627) relative to *RNU6B* and *GAPDH*, respectively, in bronchial explants CF (n = 14) and non-CF (n = 16). Student's t-test was used to determine significance.

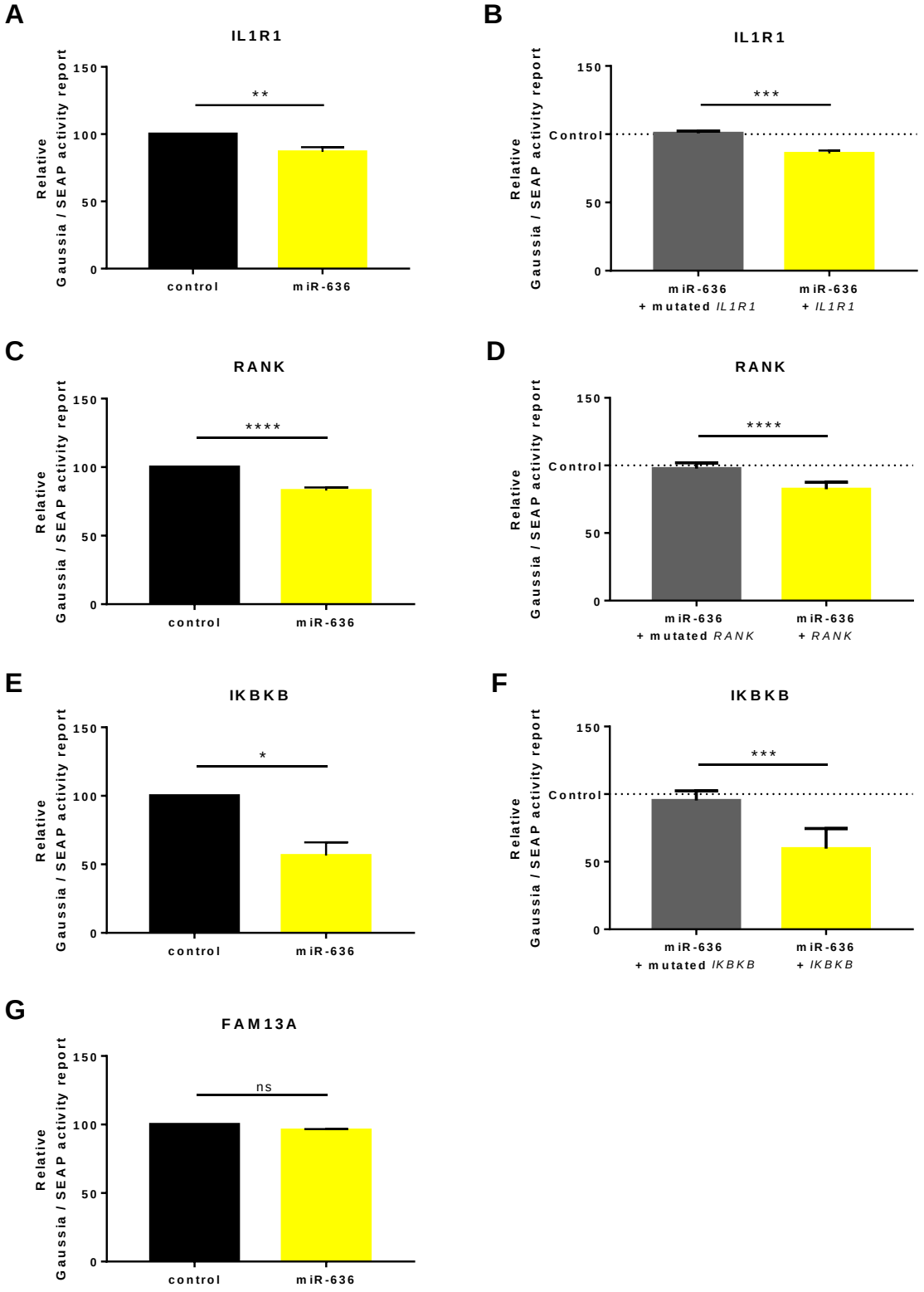


Figure 3: Study of the binding of miR-636 to 3'-UTR. Quantification of normalized luciferase activity by SEAP activity in CF cells (CFBE41o-) co-transfected with miR-636 mimic or a mimic control and an *IL1R1* 3'-UTR luciferase plasmid (A, $p = 0.0064$), *RANK* (C, $p < 0.0001$), *IKBKB* (E, $p = 0.0307$), and *FAM13A* (G, $p = 0.8170$) 3'-UTR WT ($n = 4$) or 3'-UTR of *IL1R1* (B, $p = 0.0006$), *RANK* (D, $p < 0.0001$), and *IKBKB* (F, $p = 0.004$) mutated ($n = 5$) over 48 h. Student's t-test was used to determine significance.

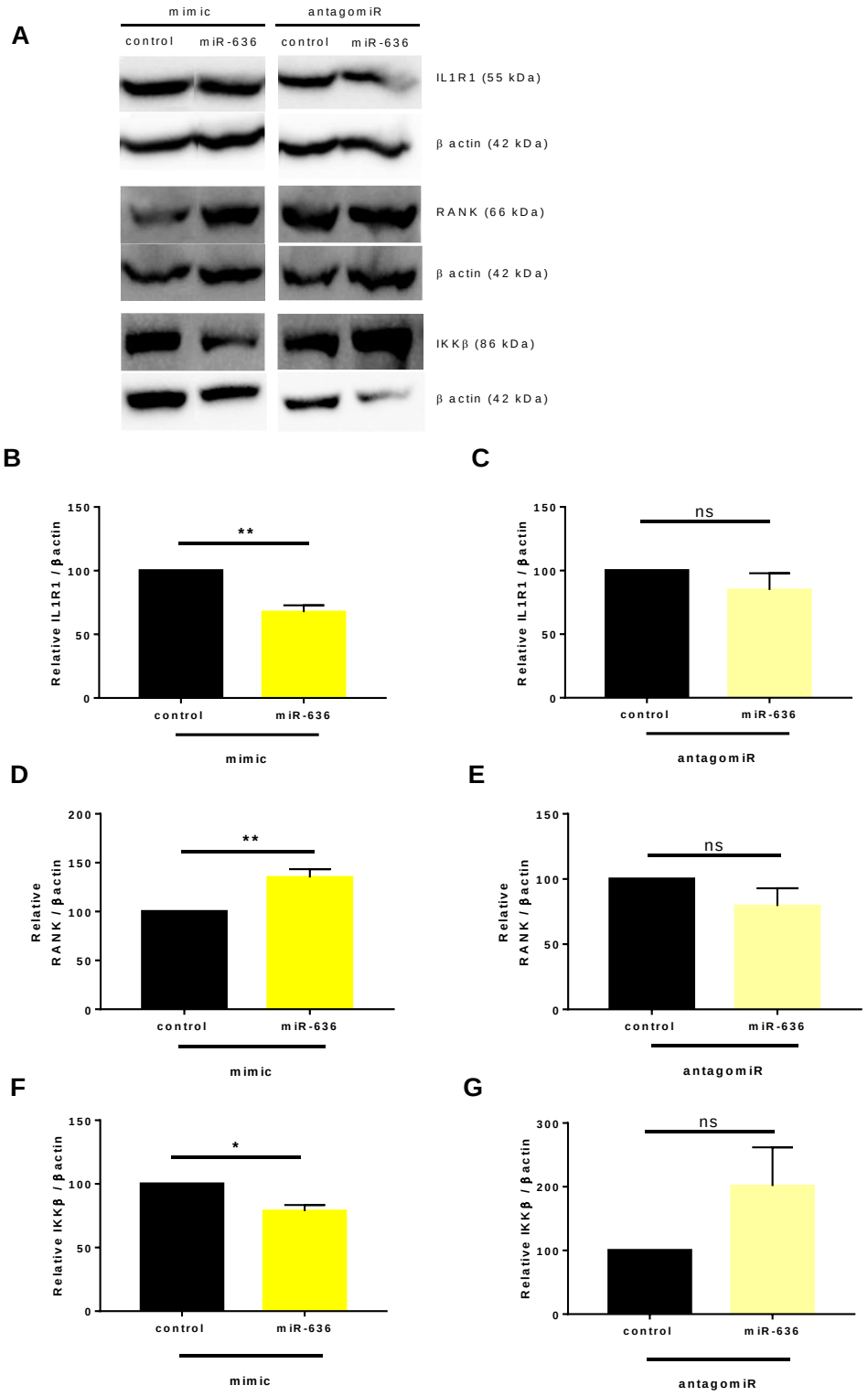


Figure 4: Effect of miR-636 on the protein expression of IL1R1, RANK, and IKKβ. Representative western blot of protein expression levels (A). Quantification of the protein expression of IL1R1 (B, n = 5, p = 0.0038), RANK (D, n = 6, p = 0.0094), and IKKβ (F, n = 5, p = 0.0113) transfected with a mimic of miR-636 or a mimic control over 48 h. Quantification of IL1R1 protein expression (C, n = 5, p = 0.3299), transfected RANK (E, n = 6, p=0.1885), and IKKβ (G, n = 6, p = 0.1569) with an antagomiR-636 or antagomiR control over 48 h. Student's t-test was used to determine significance.

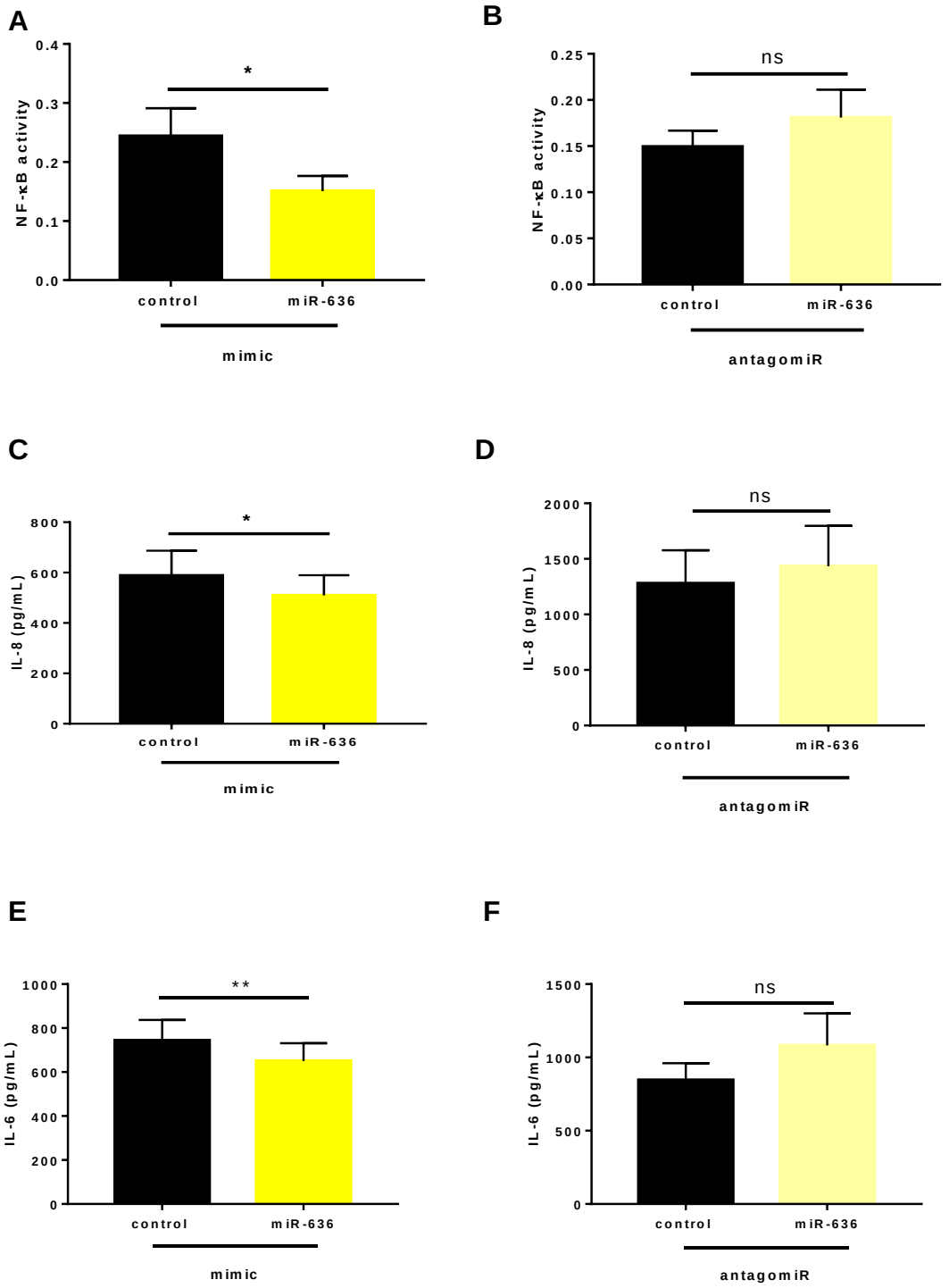


Figure 5: Effect of miR-636 on NF-κB activity and on IL-8 and IL-6 secretion. Quantification of NF-κB activity in CF bronchial epithelial cells (CFBE41o-) transfected with miR-636 mimic or control for 48 h (A, n = 7, p = 0,0154) and antagomiR-636 or antagomiR control for 48 h (B, n = 3, p = 0.1652). Quantification of IL-8 (C, n = 7, p = 0,0449) and IL-6 (E, n = 5, p = 0.0093) secretion in CF bronchial epithelial cells (CFBE41o-) transfected with miR-636 mimic or control mimic for 48 h, and antagomiR-636 or antagomiR control for 48 h (D, n = 9, p = 0.1158; F, n = 8, p = 0.0937) secretion in CF bronchial epithelial cells (CFBE41o-) transfected with antagomiR-636 or antagomiR control for 48 h. Student's t-test was used to determine significance.

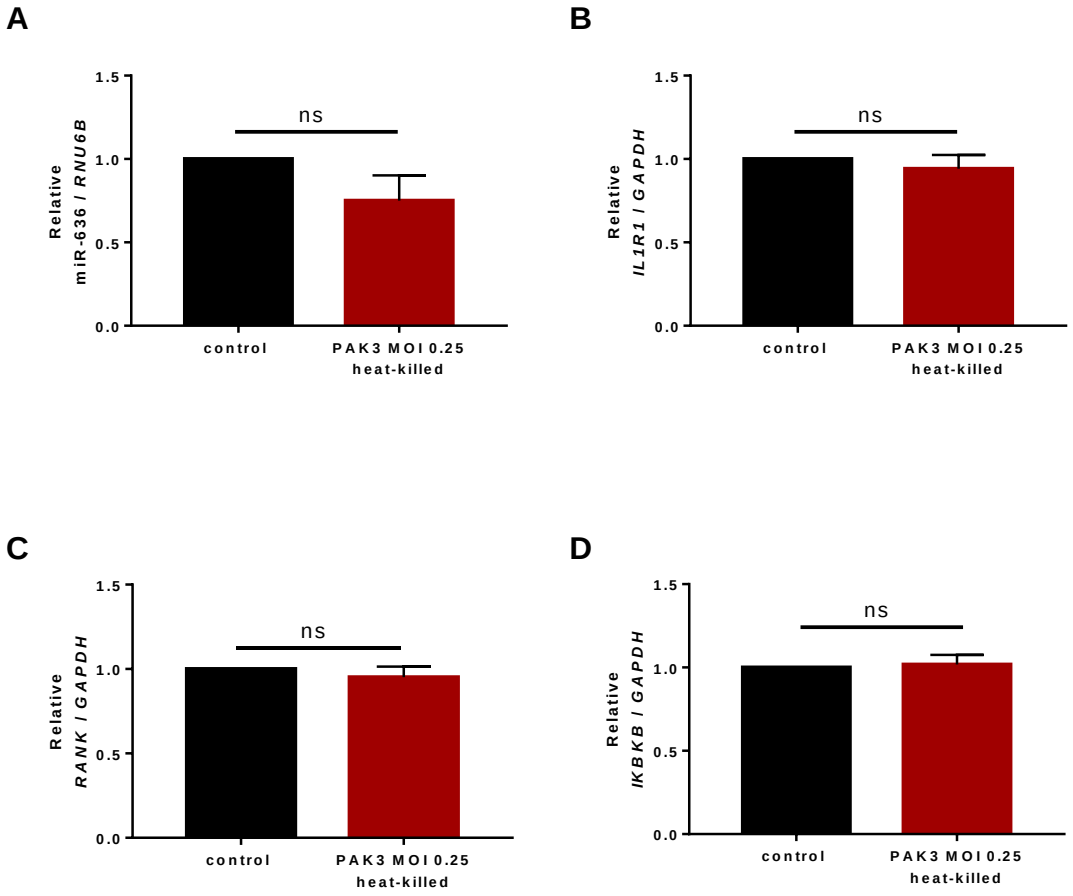


Figure 6: Effect of *Pseudomonas aeruginosa* infection on the expression of miR-636, *IL1R1*, *RANK*, and *IKBKB*. Expression of miR-636 (A, p = 0.1634), *IL1R1* (B, p = 0.4273), *RANK* (C, p = 0.444), and *IKBKB* (D, p = 0.9868) were measured in CF cells (CFBE41o-) that were stimulated by *Pseudomonas aeruginosa* strain PAK heat-killed at a MOI 0.25 or not during 24 h (n = 4). Student's t-test was used to determine significance.

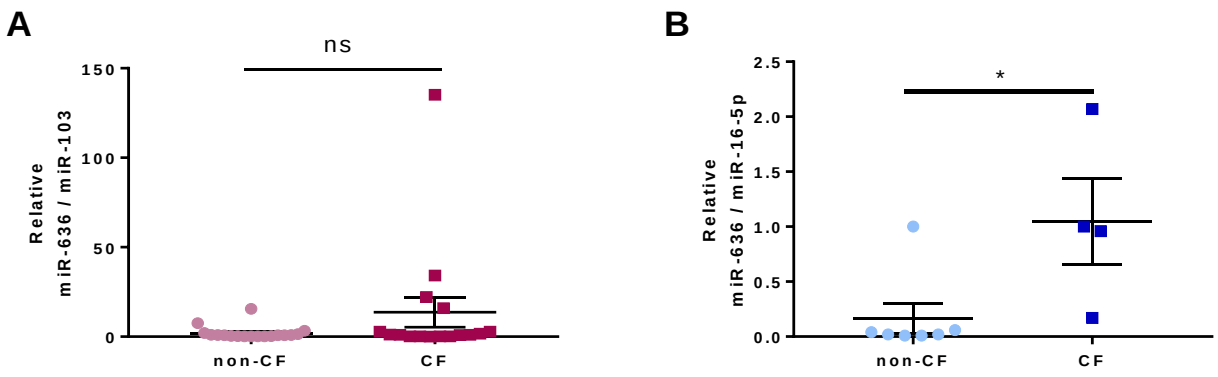


Figure 7: Expression of miR-636 in CF and non-CF plasma and neutrophils. Quantification of miR-636 expression in CF (n = 17) and non-CF (n = 18) plasma (A, p = 0.3787) or in CF (n = 6) and non-CF (n=8) neutrophils (B, p = 0.0303). A Mann-Whitney test was used to determine significance.

SUPPLEMENTARY FIGURES

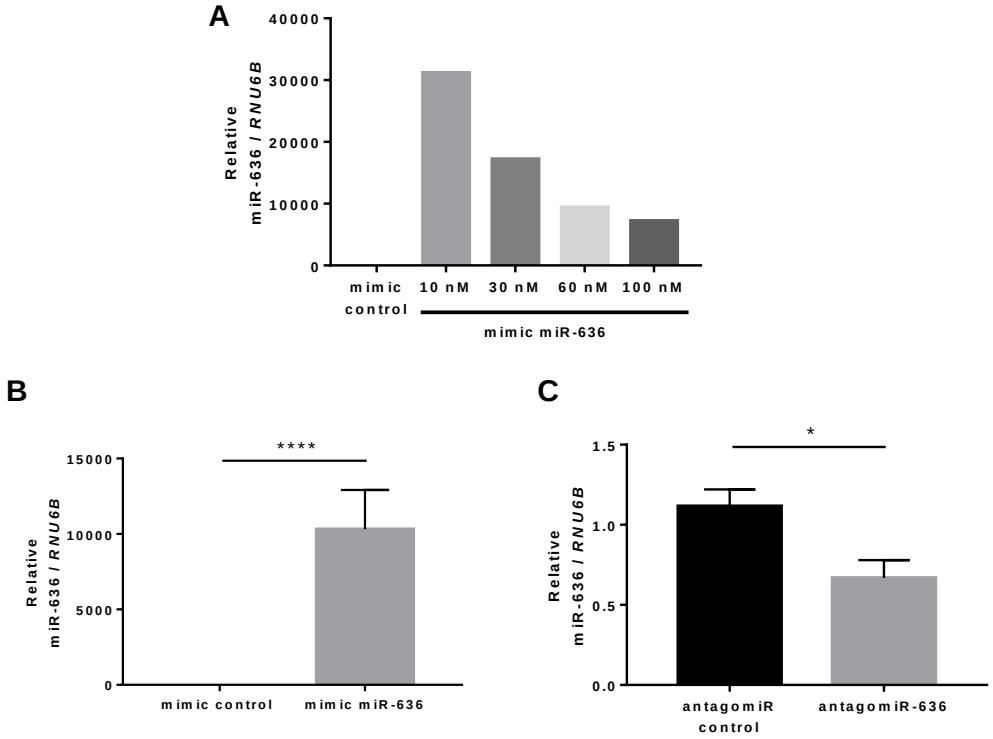


Figure S1: miR-636 transfection concentration determination. Expression of miR-636 after transfection of a mimic control or miR-636 mimic at concentrations of 10, 30, 60, or 100 nM in CF cells (CFBE41o-) (n = 1). Expression of miR-636 after transfection of a mimic control or miR-636 mimic (A, n = 6, p < 0.0001), or antagomiR control or antagomiR-636 (B, n = 6, p=0.0397) at 30 nM in CF cells (CFBE41o-) during 48 h. Student's t-test was used to determine significance.

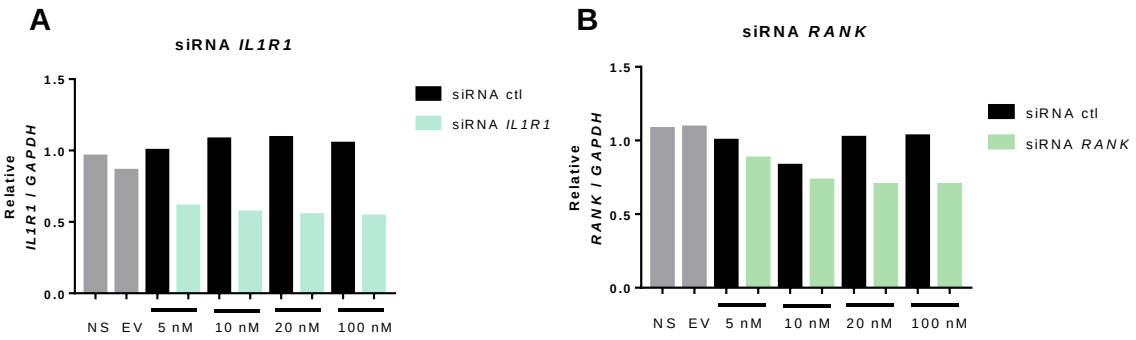


Figure S2: Expression of *IL1R1* and *RANK* following siRNA transfection. Quantification of *IL1R1* and *RANK* expressions in CF cells (CFBE41o-) after a siRNA transfection at different concentrations (ns: no stimulation, ev: empty vector, 5, 10, 20, 100 nM siRNA) during 48 h (n = 1).

V. Biomarqueurs

Dans les modèles que nous avons utilisés, nous avons mis en évidence une modulation de l'expression de trois miARN : miR-199a-3p, miR-636 et miR-9-5p dans des cellules CF. Du fait de leur rôle dans la régulation de l'inflammation, nous voulions déterminer si les miR-199a-3p et miR-636 pouvaient être utilisés en tant que biomarqueurs pronostiques de l'inflammation pulmonaire des patients CF comme cela a déjà été montré pour des cancers pulmonaires.

1. Matériels et méthodes

Les plasmas ont été prélevés au cours de prise de sang de contrôles annuels chez 25 patients CF (F508del homozygotes) âgés de 13 à 18 ans avec une moyenne d'âge de 15 ans (issus de l'hôpital Trousseau), 17 patients CF (F508del homozygotes) âgés de 6 à 17 ans avec une moyenne d'âge de 12 ans (fournis par Dr Dominique Debray) et 26 sujets sains non-CF âgé de 20 à 43 ans avec une moyenne d'âge de 25 ans.

Les échantillons ont été centrigufés pendant 15 min à 4 000 tours par minute à 4 °C puis les plamas (surnageants) ont été récoltés, aliquotés et stockés à -80 °C. Les miARN ont été extraits à l'aide du kit *Nucleospin miRNA Plasma* (Macherey-Nagel), selon les instructions du fabricant et élués avec de l'eau stérile sans RNase (30 µL). Les expériences de RT-qPCR (TaqMan) ont été réalisées avec les sondes hsa-miR-199a-3p (477961_mir), hsa-miR-636 (478185_mir), hsa-miR-9-5p (478214_mir) et hsa-miR-103 (478253_mir) comme contrôle endogène. Un test d'hémolyse des échantillons a été effectué en utilisant les sondes miR-23a-3p (478532_mir), miR-451a (478107_mir). Ce test consiste à calculer le **ΔCt hémolyse = Ct (hsa-miR-23a-3p) – Ct (hsa-miR-451a)** et à comparer le résultat à 7. Si le **ΔCt hémolyse > 7**, il y a un fort risque d'hémolyse de l'échantillon et il est recommandé de ne pas l'utiliser (Punga et al., 2014).

Les neutrophiles sanguins ont été fournis par le Pr Porter de l'*University College of London*, dans le cadre d'un MTA (*Material Transfert Agreement*). Les échantillons étaient déjà aliquotés et ont été stockés à -80 °C. Ils sont issus de 6 patients CF (F508del homozygotes) âgés de 9 à 13 ans avec une moyenne d'âge de 12 ans et de 8 sujets sains âgés de 25 à 38 ans avec une moyenne d'âge de 31 ans. Les miARN ont été extraits à l'aide du kit *Nucleospin miRNA Plasma* (Macherey-Nagel), selon les instructions du fabricant et élués avec de l'eau stérile sans RNase (30 µL). Les expériences de RT-qPCR (TaqMan) ont été réalisées avec les sondes hsa-miR-199a-3p (477961_mir), hsa-miR-636 (478185_mir), miR-9-5p-5p (478214_mir) et miR-16-5p (477860_mir) comme contrôle endogène.

2. Plasmas

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'expression de miR-199a-3p, miR-636 et miR-9-5p dans les plasmas de patients CF (Hôp. Trousseau) comparés aux sujets sains non-CF et n'avons observé aucune différence significative entre les deux groupes pour chacun des miARN (figure 56, A, C, E). Un test d'hémolyse des échantillons a par la suite été effectué et a montré que sur les 26 échantillons non-CF, 4 étaient hémolysés (4 n'ont pas pu être à nouveau extrait) et sur les 25 échantillons CF, 19 étaient hémolysés. Aussi pour ces échantillons nous avons exclu les valeurs et effectué de nouvelles mesures pour 17 échantillons CF (Dr D. Debray). Le test d'hémolyse a révélé que 10/17 des échantillons étaient non hémolysés et donc utilisables pour la mesure de l'expression de nos miARN d'intérêt.

Dans un second temps, la mesure de l'expression de miR-199a-3p, miR-636 et miR-9-5p avec des échantillons non hémolysés a permis de mettre en évidence une diminution significative de l'expression de miR-199a-3p dans les plasmas de patients CF par rapport aux sujets sains non-CF (figure 56, B). Cependant concernant les miR-636 et miR-9-5p, aucune variation significative est observée (figure 56, D, F).

De plus, l'hétérogénéité de l'expression des trois miARN retrouvée chez les patients CF et sujets sains non-CF n'est plus retrouvée lorsque les échantillons sont tous non hémolysés. Cette hétérogénéité ne serait donc pas due à une variabilité phénotypique interindividuelle mais à l'hémolyse des échantillons.

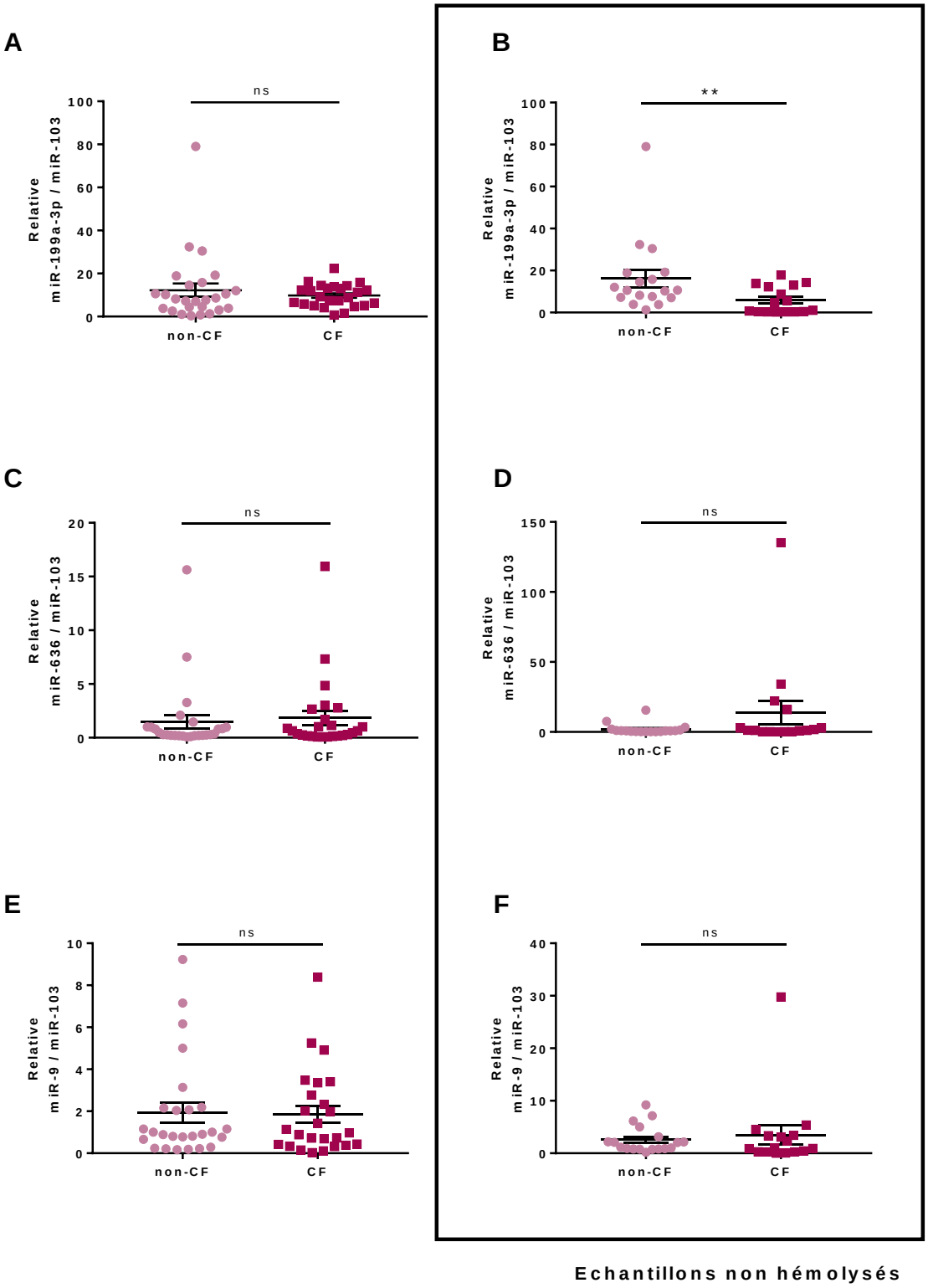


Figure 56 : Expression de miR-199a-3p, miR-636 et miR-9-5p dans les plasmas CF et non-CF. Mesure des expressions de miR-199a-3p, miR-636, miR-9-5p rapportées au miR-103 dans les plasmas CF (n=25) et non-CF (n=26) (A, p=0.5068 ; C, p=0.7331 ; E, p=0.9145) et après vérification de l'hémolyse des échantillons CF (n=16) et non-CF (n=18) (B, p=0.0097 ; D, p=0.3787 ; F, p=0.5005). Un test de *Mann-Whitney* a été utilisé pour déterminer la significativité.

3. Neutrophiles

L'inflammation constitutive est liée à l'activation de la voie de signalisation NF-κB au niveau de l'épithélium de surface. Cette voie contrôle la sécrétion en IL-8, la chimiokine clé impliquée dans le recrutement massif des PNN au niveau des VA. Les PNN sont des phagocytes professionnels, constitutifs à ~ 60 % des leucocytes circulants humains. Ils représentent les premières cellules mobilisées au site d'infection et ont pour rôle de contrôler et d'éradiquer les pathogènes. Parce que les PNN ont un double rôle d'anti-infectieux et de pro-inflammatoire, une dérégulation de ceux-ci est critique pour la physiopathologie de la mucoviscidose.

Nous nous sommes intéressés à l'expression de miR-199a-3p, miR-636 et miR-9-5p dans des neutrophiles issus de patients CF et de sujets sains non-CF. L'expression des miARN, quelle que soit la condition est hétérogène chez les patients CF contrairement aux sujets sains non-CF. Bien que l'expression de miR-199a-3p ne varie pas de manière significative (figure 57, A), les expressions de miR-636 et miR-9-5p augmentent de manière significative dans les neutrophiles des patients CF par rapport aux sujets sains non-CF (figure 57, B et C).

Ces résultats coïncident avec ceux obtenus dans les biopsies pulmonaires des patients CF et non-CF.

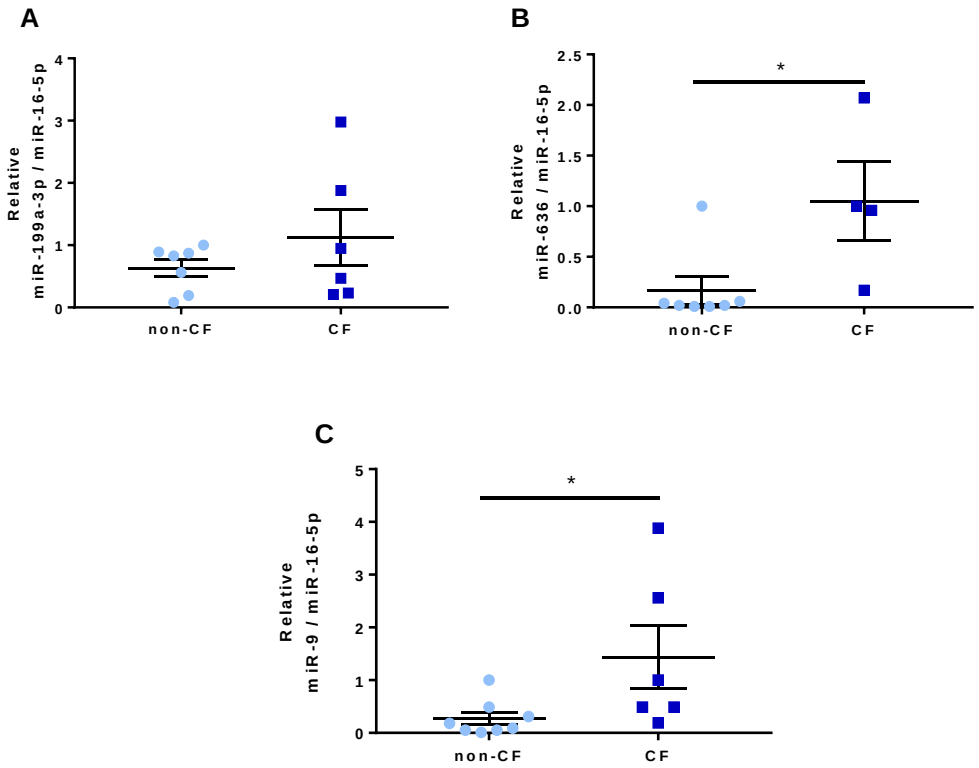


Figure 57 : Expression de miR-199a-3p, miR-636 et miR-9-5p dans les neutrophiles CF et non-CF. Mesure des expressions de miR-199a-3p (A, p=0.5338), miR-636 (B, p=0.0303), miR-9-5p (C, p=0.0213) rapportées au miR-16-5p dans les neutrophiles CF (n=6) et non-CF (n=7). Un test de *Mann-Whitney* a été utilisé pour déterminer la significativité.

4. Conclusion

Le miR-199a-3p pourrait servir de biomarqueur dans le plasma entre les patients CF et les sujets sains non-CF mais pas les miR-636 et miR-9-5p.

Les miR-636 et miR-9-5p pourraient servir de biomarqueur dans les neutrophiles entre les patients CF et les sujets sains non-CF mais pas le miR-199a-3p.

VI. *Small RNAseq* et *RNAseq* – Vertex

Dans une étude pilote (n=3) effectuée précédemment au laboratoire, nous avions observé que l'Orkambi® (Vx-809/Vx-770) semblait induire des modifications majeures de l'expression des miARN et des ARN dans des cellules épithéliales bronchiques issues de patients CF (F508del homozygotes). Cette molécule aurait donc des actions sur d'autres gènes que *CFTR* et induirait des variations importantes de l'expression des miARN.

1. Matériels et méthodes

Dans une approche globale, nous avons effectué une extraction des ARN et des miARN de cellules épithéliales bronchiques CF différenciées et cultivées en interface air-liquide. Nous avons utilisé des cellules issues de 5 patients CF provenant de la société Epithélix. Les patients sont âgés de 16 à 27 ans avec une moyenne d'âge de 23 ans ; quatre échantillons viennent de femmes et un d'un homme.

Ces cellules CF ont été stimulées ou non avec la combinaison de molécules Vx-809/Vx-770 aux concentrations respectives de 1 µM et de 0,1 nM pendant 24 h (Matthes et al., 2016). Afin d'étudier l'ensemble des ARN et des miARN dérégulés entre les cellules CF stimulées et contrôles, nous avons sélectionné le séquençage NGS comme pour le *small RNAseq* de l'article (Bardin et al., 2018a), qui permet de séquencer l'ensemble des miARN, y compris ceux non décrits dans la littérature. Tous les petits ARN étant analysés, il est nécessaire de pré-purifier les petits ARN à une taille souhaitée suivi par d'importantes analyses bio-informatiques et bio-statistiques.

Les ARN et les miARN ont été isolés par un kit d'extraction *Nucleospin miRNA kit* (Macherey-Nagel) dans un volume d'élution final de 30 µL. La concentration et la qualité ont été quantifiées au spectrophotomètre (DeNovix). Les échantillons ont ensuite été envoyés à la plateforme IPMC de Nice. Les données obtenues ont été analysées par des bio-statisticiens et bio-informaticiens de la plateforme afin de considérer les différences d'expression entre les cultures CF stimulées par Vx-809/Vx-770 ou non.

2. Résultats

Sur les cinq échantillons envoyés, et passés au *RNAseq* et *small RNAseq*, seuls quatre ont finalement été conservés pour l'analyse. En effet, sur les cinq échantillons, il y avait un échantillon venant d'un homme et quatre venant de femmes. Il a été rapporté que cet échantillon amenait les gènes des chromosomes X/Y à apparaître comme étant exprimés de manière différentielle et a donc été enlevé pour la suite de l'analyse des données.

1) *RNAseq* - Vertex

Les résultats du *RNAseq* ont montré une expression différentielle de 27 ARNm entre les cellules CF stimulées par Vx-809/Vx-770 par rapport aux cellules non stimulées (figure 58 et tableau 12).

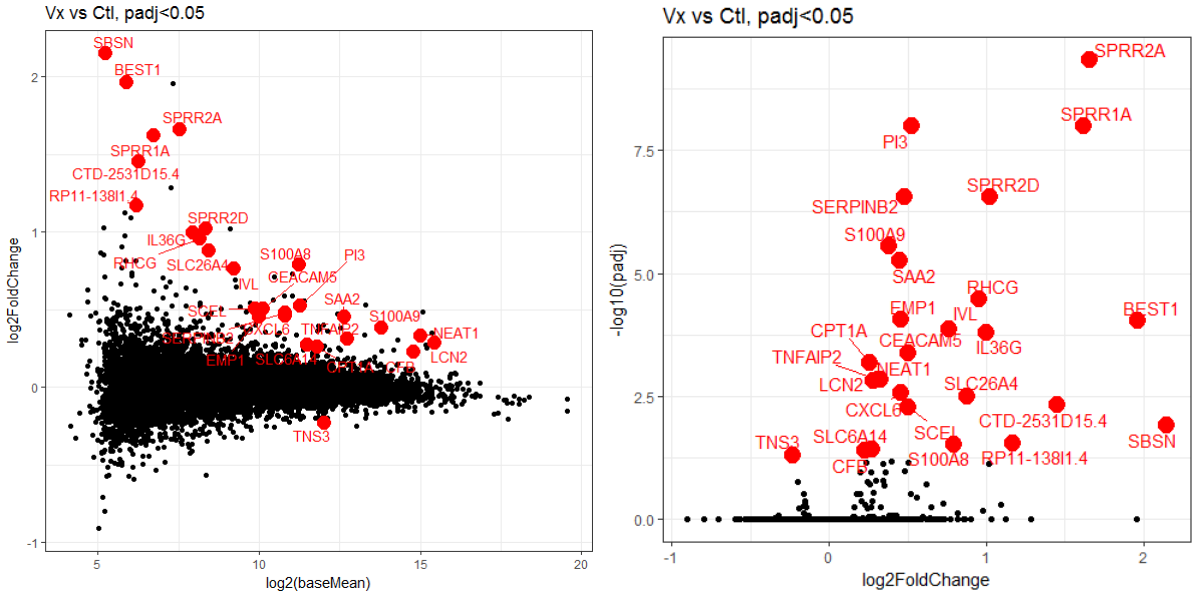


Figure 58 : Résultats du *RNAseq*. Représentation des 27 gènes différentiellement exprimés dans les cellules CF ± Vx-809/Vx-770 avec une *Pvalue* ajustée <0.05 (*log2baseMean*, à gauche et *log2FoldChange*, à droite).

Parmi les gènes dérégulés suite à la stimulation par la combinaison des molécules Vx-809/Vx-770, on retrouve des gènes impliqués dans l'inflammation, la régulation flux ioniques (canaux et transporteurs), les défenses anti-infectieuses, la biologie du développement et la kératinisation ainsi que des protéines de surface ou de liaison au calcium (tableau 13).

GENE ID	GENE NAME	LOG2 FOLDCHANGE VX-CTL	PADJ VX-CTL
SPRR2A	*Small Prolin Rich Protein 2A*	1.659131829	4.52048^{E}-10
SPRR1A	*Small Prolin Rich Protein 1A*	1.619375578	1.01954^{E}-08
PI3	*Peptidase*	0.522748686	1.01954^{E}-08
SPRR2D	*Small Prolin Rich Protein 2D*	1.023513282	2.82071^{E}-07
SERPINB2	*Serpin family B member 2*	0.47776299	2.82071^{E}-07
S100A9	*S100 calcium binding protein A9*	0.383803273	2.82627^{E}-06
SAA2	*Serum Amyloid A2*	0.45327718	5.65194^{E}-06
RHCG	*RH family C Glycoprotein*	0.956472336	3.37303^{E}-05
EMP1	*Epithelial Membrane Protein 1*	0.456281509	8.71703^{E}-05
BEST1	*Bestrophine 1*	1.96508875	9.36598^{E}-05
IVL	*Involucrine*	0.76087391	0.000138483
IL36G	*Interleukine 36 gamma*	0.998595405	0.000158124
CEACAM5	*Carcinoembryonic Antigen Related Cell Adhesion Molecule 5*	0.50627106	0.000410013
CPT1A	*Carnitine Palmitoyltransferase 1A*	0.258978271	0.000656743
NEAT1	*Nuclear Enriched Abundant 1*	0.329373616	0.001444499
TNFAIP2	*TNF alpha Induced Protein 2*	0.309113795	0.001484645
LCN2	*Lipocalin 2*	0.283497119	0.00152568
CXCL6	*Interleukine 6*	0.457271912	0.002674657
SLC26A4	*Solute Carrier family 26 (Anion Exchanger), member 4*	0.877669826	0.003128833
CTD-2531D15.4	Gène non caractérisé	1.455076788	0.004766966
SCEL	*Sciellin*	0.507257408	0.00542385
SBSN	*Suprabasin*	2.149344899	0.01207053
RP11-138I1.4	?	1.170919727	0.028730629
S100A8	*S100 calcium binding protein A8*	0.791744702	0.029885306
SLC6A14	*Solute Carrier Family 6 Member 14*	0.270649524	0.037556737
CFB	*Complement Factor B*	0.226827336	0.040091259
TNS3	*Tensin 3*	0.23371	0.048492

Tableau 12 : Résultats du *RNAseq* : liste des 27 gènes différentiellement exprimés dans les cellules CF ± Vx-809/Vx-770. En vert : les gènes sous-exprimés (log2 FC < 0,5), en orange : proche de la significativité de sur-/sous-expression, en rouge : les gènes sur-exprimés (log2 FC > 2) et en blanc les gènes non significatifs dans la condition stimulée par rapport au contrôle.

PROCESSUS	GENE	ROLE	FONCTION
Inflammation et immunité innée	*IL36G*	Interleukine	Liée à la famille IL-1, régule le système immunitaire
	CXCL6	Interleukine	Inflammation et maturation des cellules B
	TNFAIP2	Récepteur	Signalisation cellulaire *via* activation par TNF-α
	CFB	Protéine	Activation du complément
	S100A9	Protéines de liaison au Ca^{2+}	Progression du cycle cellulaire, différenciation, activation de TLR4, lié au mégakaryocyte dans l'obésité
	S100A8		
Régulation	*Best1*	Canaux Cl^-/autres ions	Régule les canaux Ca^{2+} type L voltage dépendant
	SLC26A4		Transport du bicarbonate, de sucres, d'acides biliaires, d'ions métalliques et de composés aminés.
	SLC6A14		
	RHCG	Transporteurs	
	LCN2		Transport de petites molécules hydrophobes : lipides, hormones stéroïdes, rétinoïdes
Anti-infectieux			Limite la croissance bactérienne (chélate le fer dans des sidérophores)
	PI3	Peptidase Défensine	Inhibiteur spécifique de l'élastase, peptide anti-microbien contre les bactéries Gram + et -, les champignons
Biologie du développement	*SPRR2A*	Protéines d'enveloppe réticulée des kératinocytes	Développement et kératinisation
	SPRR1A		
	SPRR2D		
	SCEL		
	IVL		
Multiple	*EMP1*	Protéines de surface	Différenciation, l'apoptose, la polarité cellulaire, l'adhésion, le métabolisme des protéines
	CEACAM5		
	TNS3	Protéine	Motilité cellulaire par GPCR, remodelage de l'actine, dissociation du complexe intégrine-tensine-actine
Métabolisme	*CPT1A*	Protéine	Oxydation mitochondriale des AG à chaînes longues
Autre	*NEAT1*	Régulateur de transcription	Production de lnc
	SAA2	Apolipoprotéine	Micronutriment : sélénium
	SERPINB2	Serpine	Associée à PAI1
Circulation sanguine	*SBSN*	Protéine	Perméabilité veineuse périphérique
Inconnu	*CTD-2531D15.4*	Gènes non référencés	
	RP11-138l1.4		

Tableau 13 : Répartition des 27 gènes différentiellement exprimés en fonction de leur rôle.

2) *Small RNAseq*

De manière surprenante, alors que dans l'étude pilote (n=3) effectuée au laboratoire précédemment, nous avions observé que l'Orkambi® (Vx-809/Vx-770) semblait induire des modifications majeures de l'expression des miARN, ce nouveau *small RNAseq* semble indiquer qu'il n'y a aucun miARN différentiellement exprimé de manière significative après ajustement des *p-values* entre les cellules CF stimulées par Vx-809/Vx-770 comparées aux cellules CF non stimulées (figure 59).

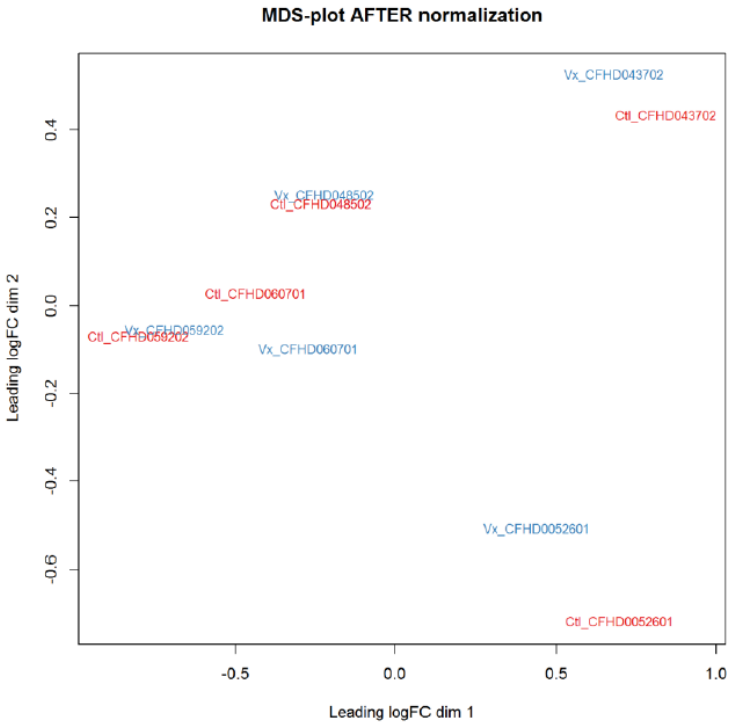


Figure 59 : Analyse en composantes principales des données issues du *small RNAseq*.

DISCUSSION

L'atteinte pulmonaire présente chez les patients atteints de mucoviscidose est la première cause de morbidité et de mortalité. La déficience de la protéine CFTR ou de son activité à la face apicale des épithélia sécréteurs entraîne un déséquilibre ionique et une déshydratation du liquide de surface des VA menant à un épaississement du mucus. L'hyperviscosité résultante altère la clairance mucociliaire, favorise la colonisation bactérienne et l'établissement de cycles infection/inflammation, qui sur le long terme dégradent l'épithélium pulmonaire conduisant à une insuffisance respiratoire chez les patients CF. Bien que de nouvelles thérapies ont vu le jour, aucune n'est capable de soigner les patients indépendamment de leur mutation *CFTR*, elles se focalisent le plus souvent sur l'expression ou l'activité de la protéine CFTR.

Pourtant la mucoviscidose est aussi caractérisée par une hyper-inflammation, dont l'origine et la dérégulation restent non élucidées, puisque l'hypothèse du processus déclencheur : infection ou inflammation, fait toujours polémique (Welsh and Smith, 1995), même si plusieurs études tendent vers le fait que l'inflammation précèderait l'infection de par la dysfonction intrinsèque de CFTR. Cette inflammation constitutive est notamment liée à la sur-activation de la voie de signalisation NF-κB au niveau de l'épithélium de surface (Boncoeur et al., 2008b; Tabary et al., 1998). Cette voie contrôle la sécrétion d'IL-8, chimiokine clé impliquée dans le recrutement massif des PNN au niveau des VA (Dhooghe et al., 2014; McNally et al., 2011; Nakamura et al., 1992). NF-κB est un facteur de transcription nucléaire impliqué dans de nombreux processus cellulaires et jouant un rôle fondamental dans la réponse immunitaire, notamment par la sécrétion de cytokines, telles que l'IL-8. Dans la mucoviscidose, l'origine de la dérégulation de NF-κB reste incertaine, malgré de nombreuses publications. Pourtant la seule approche thérapeutique présente sur le marché en France reste l'utilisation des glucocorticoïdes en dehors de l'ibuprofène qui présentent de nombreux effets secondaires. Mais cibler l'activation de la voie de signalisation NF-κB de manière spécifique pourrait contribuer à une meilleure régulation de l'inflammation, avec une activation de ce processus uniquement en cas d'infection pulmonaire des patients CF et par conséquent arrêter les cycles infection/inflammation qui dégradent l'épithélium pulmonaire.

Cette hyper-activation de la voie NF-κB pourrait être en partie due à des régulations post-transcriptionnelles par les microARN comme cela a déjà été montré dans d'autres pathologies pro-inflammatoires (Chen et al., 2008a; Dai et al., 2012). Nous nous sommes donc intéressés aux miARN qui sont de petits ARN simple brin non codants qui régulent négativement l'expression des gènes de façon post-transcriptionnelle. Dans le contexte de la mucoviscidose et dans le contexte inflammatoire, il a été montré que des miARN pouvaient réguler l'IL-8 (Fabbri et al., 2014; Oglesby et al., 2015) mais aucun miARN n'a été recensé comme régulant la voie NF-κB.

L'objectif de ce travail était d'étudier le rôle des miARN dans la physiopathologie pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose.

La méthode utilisée se base sur deux approches complémentaires :

1. Stratégie globale, sans *a priori*, pour laquelle l'ensemble des miARN (*small RNAseq*) et des ARNm (*RNAseq*) des cellules épithéliales bronchiques issues de patients CF et de sujets sains (non-CF) ont été cultivées en interface air-liquide.
2. Stratégie ciblée, qui vise à étudier les miARN impliqués dans la régulation de protéines d'intérêt (base de prédiction bio-informatique de l'interaction entre un miARN et sa cible).

I. *Small RNAseq* & *RNAseq* : Dérégulation de miR-199a-3p et conséquences sur la voie NF-κB

Dans un premier temps, nous avons étudié les miARN et ARN extraits à partir de cultures primaires de patients CF et non-CF de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide qui est le modèle le plus représentatif d'un épithélium pulmonaire humain.

Les résultats du *RNAseq* ont montré une expression différentielle faible des ARN entre les cellules CF et non-CF cultivées en interface air-liquide, basale, sans stimulation. Nous avons mis en évidence que 18 gènes sont significativement dérégulés entre les deux groupes : 11 sous-exprimés et 7 sur-exprimés. Cette faible différence d'expression pourrait s'expliquer par l'état quiescent des cellules qui sont peu proliférative et qui ont été cultivées dans un contexte non infectieux ou inflammatoire. La première source de variation de nos échantillons provient de la différence inter-individuelle des échantillons. Parmi ces 18 gènes dérégulés, 50 % sont sous la dépendance ou régulent la voie NF-κB, illustrant le rôle central et prépondérant de cette voie de signalisation dans la dérégulation des processus inflammatoires dans le contexte CF.

Les résultats du *small RNAseq* ont montré 11 miARN différemment exprimés entre les cellules CF et non-CF : 2 sous-exprimés (dont le miR-199a-3p) et 9 sur-exprimés. Aucun de ces miARN n'a été montré ou prédit comme pouvant réguler CFTR. Par une analyse combinatoire, nous avons mis en évidence que le miR-199a-3p était impliqué de façon importante dans la moitié des 18 gènes montrés dérégulés par le *RNAseq via* la voie de signalisation NF-κB. En effet, par une étude fonctionnelle, nous avons montré que le miR-199a-3p agit sur la voie de signalisation NF-κB en se fixant sur le 3'-UTR de l'ARNm d'*IKBKB* entraînant une diminution de son expression protéique ainsi que celles de deux autres acteurs de la voie (phospho IκBα et NF-κB), une diminution de l'activité de NF-κB et par conséquent de la sécrétion en IL-8, cytokine principale impliquée dans le recrutement des PNN au niveau des VA.

Le miR-199a-3p est donc un régulateur négatif de l'activation de la voie de signalisation NF-κB et sa faible expression participerait à l'hyper-inflammation retrouvée au niveau des VA des patients CF.

Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature, dans des études portant sur le cancer ovarien (Chen et al., 2008a) et des cellules endométriales (Dai et al., 2012). Ces deux études ont montré respectivement un rôle fonctionnel du miR-199a-3p comme inhibiteur direct d'IKKβ dans des cellules épithéliales ovariennes cancéreuses et par conséquent une modulation de la voie NF-κB ; l'inhibition de NF-κB *via* la transfection du miR-199a-3p peut abolir le développement et la maintenance de l'endométriose, en partie en réduisant la sécrétion et l'invasion de médiateurs pro-inflammatoires. Si l'expression de certains miARN est tissu-spécifique, nous avons montré que le miR-199a-3p pouvait inhiber la même cible mais dans différents types cellulaires. Ce miARN est aussi capable d'agir sur d'autres cibles impliquées dans divers processus cellulaires, illustrés dans le tableau suivant :

CIBLE	CONTEXTE	ROLE	EXPRESSION	AUTEUR	ANNEE
IKBKB	Cancer ovarien	Inflammation	Diminuée	Chen	2008
CAV2	Cancer du sein	Progression tumorale, survie, prolifération cellulaire	Augmentée	Shatseva	2011
IKBKB	Cancer de l'endomètre	Inflammation	Diminuée	Dai	2012
mTOR	Adénocarcinome endométrioïde endométrial	Prolifération cellulaire		Wu	2013
IGF1/Akt/mTOR	Régulateur myogenèse	Différenciation des myoblastes	Augmentée	Jia	
APG, MGMT	Cancer des testicules	Gène suppresseur de tumeur		Chen	2014
PI3K/Akt/mTOR	Blessure ischémique	Signaux de facteur de croissance Structure cellulaire		Selvamani	
HGF (Hepatocyte growth factor), cMet	Carcinome rénal	Prolifération cellulaire	Diminuée	Huang	
MET et mTOR	Carcinome papillaire de la thyroïde (PTC)	Migration Prolifération		Minna	
/	Cancer colorectal	Invasion	Augmentée biomarqueur	Nonaka	
ZHX1 (Zinc Fingers and homeoboxes 1)	Cancer gastrique	Prolifération Suppression de l'apoptose cellulaire	Augmentée	Wang	
RTK AXL et Phospho Akt	Ostéosarcome	Migration Invasion	Diminuée	Tian	
mTOR	Gliome	Croissance et prolifération		Shen	2015
/	Ostéosarcome	Croissance cellulaire		Zhang	
Phospho cMet, Akt	Carcinome ovarien	Prolifération Adhésion Invasion		Kinose	
CD44	Ostéosarcome	Développement des métastases		Gao	
YAP1 (Yes associated protein 1)	Carcinome hépatocellulaire (HCC)	Apoptose, prolifération	Diminuée	Ren	2016
CD151		Développement des métastases, invasion, migration		Kim	
CD44, cMyc, CCND1, EGFR	Cancer de la prostate	Action tumorigénique		Liu R	
SP1	Cancer des testicules	Métabolisme du glucose		Liu X	
DDIT4, ING4	Lésion ischémique/reperfusion	Cardioprotection		Park	
Cox2	Arthrose	Inflammation		Rasheed	
/	Diabète de type 2 (DT2)	Inflammation, métabolisme	Augmentée	Gu	
SMAD1	Cancer de la prostate	Prolifération, invasion	Diminuée	Qu	2017
CDK7				Li J	
DDR1	Cancer de l'ovaire	Migration, invasion		Deng	

TFAM	Cancer du sein	Résistance au cisplatine*		Fan	
ZHX1/ PUMA	HCC	Tumorigenèse		Guan	
VEGF, VEGFR1, VEGFR2	HCC	Croissance, migration, invasion, angiogenèse		Ghosh	
MDR1, mTOR	Cholangiocarcinome	Sensibilité au cisplatine*		Li Q	
/	PTC	Invasion		Liu	
SCD (Stearoyl-CoA desaturase)	Masse corps gras	Prolifération, différenciation des adipocytes et acides gras	Augmentée	Tan	
IGF1, mTOR	Zones ostéocytaires ovariectomisées	Autophagie		Fu	
Ecadherine, Notch	HCC	Invasion		Giovannini	
RB1 (Retinoblastoma 1)	Arthrite rhumatoïde	Prolifération, apoptose		Wangyang	
PI3K/Akt/NF-κB	DT2, blessure endothéliale vasculaire	Prolifération, migration, autophagie		Wang	
PAK4 (p21 activated kinase 4)	Cancer œsophage	Prolifération	Diminuée	Phatak	
mTOR, PAK4	HCC	Croissance tumorale		Callegari	
/	Carcinome à cellules claires rénales	Croissance, formation colonie, invasion, migration, apoptose		Liu	
mTOR	Différenciation des adipocytes bruns	Maintenance thermogénique		Gao	2018
IKBKB	Mucoviscidose	Inflammation		Bardin	
ITGB8	Cancer ovarien	Résistance au cisplatine*		Cui	
NO	Homéostasie cardiaque	Tonus contractile	Augmentée	Joris	
ZEB1	Mélanome	Apoptose, migration, invasion		Liang	
AK4	Ostéosarcome	Résistance au traitement	?	Lei	
	Cancer de l'œsophage	Biomarqueur radiorésistance		Zang	
ZHX1	Cardiopathies ischémiques et régénération tissulaire	Prolifération		Zhang	
mTOR	Blessure rénale	Apoptose		Yang	
MEF2C	Différenciation de cellules souches embryonnaires myocardiques	Cardiogenèse	Augmentée	Chen	
KDM6A, Wnt	Différenciation adipogénique des cellules souches issues de la moelle osseuse	Métabolisme		Shuai	2019
/	Cancer hépatique	Croissance, métastases	?	Ma	
CD151	Cardiomyocytes	Prolifération des cardiomyocytes		Tao	

Tableau 14 : Tableau représentant les cibles et rôles de miR-199a-3p dans différents contextes pathologiques de 2008 à 2019 (2008-2015 : non exhaustif, 2016-2019 : exhaustif) (* : traitement qui inhibe la réplication et induit la mort cellulaire).

Parmi les miARN différentiellement sous-exprimés dans les cellules issues de patients CF par rapport aux patients non-CF, nous avons focalisé notre étude sur le miR-199a-3p, de par son lien avec la voie NF-κB mais aussi parce que le miR-199b-3p est en fait une isoforme avec une séquence identique au miR-199a-3p (Dabbah et al., 2017).

La dérégulation de l'expression de ce miARN, expliquant en partie l'hyper-inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose, reste non élucidée. En condition basale, nous avons montré que la dérégulation de l'expression de miR-199a-3p n'était pas retrouvée au niveau de l'expression des deux pre-miR qui le synthétisent.

L'article basé sur ces résultats (Bardin et al., 2018a) a permis de mettre en évidence la dérégulation de l'expression du miR-199a-3p dans les cellules CF par rapport aux non-CF, de montrer que ce miARN est capable de cibler et d'inhiber l'activation de la voie NF-κB *via* IKKβ et par ce biais régule 50 % des ARNm différentiellement exprimés retrouvés dans le *RNAseq*. En régulant l'une des voies de signalisation majeure de l'inflammation, le miR-199a-3p pourrait représenter une potentielle cible thérapeutique de régulation de ce processus.

L'administration d'un mimic de miR-199a-3p a été montrée comme possible dans une étude portant sur le carcinome hépatocellulaire (HCC) chez des souris, lorsqu'il est transporté par des nanoparticules lipidiques (DOPE : linoleic acid : DMG-PEG) et injecté 3 fois/semaine pendant 3 semaines à une concentration finale 5 mg/kg (Callegari et al., 2018). La même année, une autre équipe a montré la potentielle délivrance par des nanoparticules dipeptidiques (lactobionic acid arginine α,β-dehydrophenylalanine) du miR-199a-3p par des injections intraveineuses à des souris nudes atteintes de tumeur HCC (Varshney et al., 2018). En 2019, l'utilisation d'exosomes issus de cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse humaine permet de transférer le miR-199a-3p dans un modèle *in vitro* de cellules rénales (Zhu et al., 2019). L'utilisation de miR-199a-3p comme cible thérapeutique est donc possible et pourrait être appliquée au contexte de la mucoviscidose.

Cependant il reste indispensable de déterminer qu'elle est l'origine de la dérégulation de l'expression de miR-199a-3p.

II. Régulation de l'expression de miR-199a-3p

Les études portant sur les miARN, se focalisent généralement sur l'impact d'une dérégulation de l'expression d'un miARN sur une/plusieurs cibles, mais peu s'intéressent à l'origine de la dérégulation de leur expression. Nous, nous avons axé nos recherches sur l'origine de la dérégulation de l'expression de miR-199a-3p.

Nous avons supposé que cette dérégulation pouvait être due au contexte pro-inflammatoire déjà présent, à une dysfonction intrinsèque de CFTR ou à des modulations de flux calciques intracellulaires.

Considérant l'hypothèse selon laquelle la diminution de l'expression du miR-199a-3p pouvait être due à une boucle de régulation par le contexte pro-inflammatoire présent dans les VA des patients CF, nous avons stimulé des cellules CF avec deux cytokines pro-inflammatoires (IL-1β ± TNF-α). Nous avons montré que le contexte pro-inflammatoire semblait influencer l'expression de miR-199a-3p notamment *via* une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires dans des cellules CF montrant une modulation de l'expression de miR-199a-3p qui était significative avec l'IL-1β seul pendant 6 h. Mais pourtant cela n'explique pas l'origine de sa dérégulation puisque nous avons vu qu'une stimulation par ces cytokines post-transfection du mimic de miR-199a-3p, ne semblait pas entraîner de modulation de l'expression de celui-ci. Parce que le contexte pro-inflammatoire n'agit pas directement sur le miARN exogène, ni sur le miARN endogène mais peut potentiellement agir sur l'expression du pre-miR, il pourrait être intéressant de voir les conséquences d'une stimulation pro-inflammatoire sur les pre-miR. L'utilisation d'un anti-inflammatoire quant à lui, la dexaméthasone, semble n'entraîner aucune variation de l'expression de miR-199a-3p sauf à la concentration de 1 µg pendant 6 h.

Dans un second temps, nous avons vérifié si la sous-expression de miR-199a-3p pouvait être directement liée au défaut de l'activité de CFTR. Nous avons donc mesuré l'expression de ce miARN après avoir, par deux approches, modulé l'expression ou l'activité de canal Cl^- de CFTR. Afin de diminuer l'activité de CFTR, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique (inh172) de la fonction d'activité Cl^- du canal de CFTR sans altérer sa structure ou sa localisation membranaire dans des cellules épithéliales bronchiques non-CF. Ensuite afin d'augmenter l'expression et l'activité de CFTR à la membrane apicale des cellules épithéliales bronchiques CF, nous les avons stimulées avec une combinaison des molécules *Vertex Pharmaceuticals* : Vx-809/Vx-770. Cette stimulation permet le réadressage du canal à la membrane et la potentialisation de son activité. Dans les deux contextes, nous n'observons aucune modulation significative de l'expression de miR-199a-3p. La dysfonction intrinsèque de CFTR ne semble donc pas impacter directement l'expression de miR-199a-3p dans le contexte de la mucoviscidose.

Pourtant un défaut de la protéine CFTR à la face apicale des épithélia sécréteurs mène à un défaut de sa fonction chlorure entraînant alors une augmentation de $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$ à l'origine de l'hyper-activation de la voie NF-κB (Tabary et al., 2006a). Mais le lien direct entre la dysfonction de CFTR, la variation du flux calcique et l'activation de cette voie n'est pas connu. D'après nos résultats précédents, miR-199a-3p régule l'activation de la voie NF-κB en ciblant le 3'-UTR d'*IKBKB*.

Pour déterminer si le miR-199a-3p pouvait être le lien entre la dysfonction de CFTR, la modulation de $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$ et la voie NF-κB, nous avons mesuré l'expression de ce miARN, après avoir modulé la $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$ avec un activateur calcique, la thapsigargine, dans des cellules non-CF ou avec un chélateur calcique, le bapta-AM, dans des cellules CF. La modulation de la concentration intracellulaire de calcium a permis de mettre en évidence qu'une diminution de celle-ci dans des cellules CF entraînait une augmentation significative de l'expression de miR-199a-3p et cela *via* la modulation de l'expression du gène qui le synthétise à savoir le pre-miR-199a-1. Aucune variation significative n'a été observée concernant le pre-miR-199a-2. Des résultats similaires dans des cellules non-CF ont été retrouvés.

Il a été montré qu'une activation d'ENaC entraînait une phosphorylation de CREB (*c-AMP Response Element-Binding protein*) (Ruan et al., 2012), qui transloque dans le noyau et inhibe l'expression de miR-199a-3p dans un modèle de cellules épithéliales endométriales humaines (Sun et al., 2014), sans pour autant montrer si cela passe bien par le pre-miR-199a-1 et/ou pre-miR-199a-2. Pour compléter cette partie de l'étude, il serait intéressant de voir quel serait l'effet de la phosphorylation de CREB sur les expressions des pre-miR-199a et sur l'expression du miR-199a-3p dans notre modèle de cellules épithéliales bronchiques issues de patients CF.

Les interactions entre les miARN et le calcium sont prévalentes dans la littérature et jouent un rôle fondamental dans plusieurs pathologies (Finger and Hoppe, 2014; Harada et al., 2014; Magenta et al., 2016). Bien que notre étude se soit focalisée sur l'impact d'une modulation calcique sur le miR-199a-3p, il faudrait envisager une possible action de notre miARN sur le calcium. Le miR-199a-3p a été montré comme pouvant réguler différents processus cellulaires : prolifération, différenciation, apoptose (Jia et al., 2013; Minna et al., 2014; Wang et al., 2014; Wu et al., 2013) en plus de l'inflammation et cela possiblement *via* des gènes encodant des transporteurs de calcium localisés sur le RE tels que SERCA, IP3R ou RYR comme montré pour d'autres miARN (Finger and Hoppe, 2014).

Bien que le *small RNAseq* ait été effectué sur des cellules épithéliales bronchiques issues de patients CF et de sujets sains non-CF en conditions basales, il nous semblait essentiel de vérifier quel pourrait être l'impact d'une infection bactérienne par *P. aeruginosa* sur l'expression de miR-199a-3p. En effet, dans les VA des patients adultes CF, le pathogène le plus fréquemment retrouvé est *P. aeruginosa*.

Aucune différence significative de l'expression des TLR2 et 4 n'a été retrouvée dans les CFBE41o- (Greene et al., 2005) par rapport aux non-CF. La réponse inflammatoire observée est caractérisée par l'activation de la voie NF-κB et des sécrétions de médiateurs pro-inflammatoires suite à une infection par *P. aeruginosa*, qui n'implique pas les TLR. Les PNN et les bactéries retrouvées dans les LBA des souris $TLR2^{-/-}$ et $TLR4^{-/-}$ infectées sont identiques aux souris contrôles (Ramphal et al., 2005).

Il est suggéré que la réponse inflammatoire impliquerait l'autre sous famille de récepteur membranaire : IL1R. Des souris KO TLR2 infectées par *P. aeruginosa* auraient une réponse immunitaire similaire à celle observée chez des souris WT, alors que des souris IL1R$^{-/-}$ infectées par *P. aeruginosa* ont un taux de colonisation supérieur à celui observé chez les souris WT (Reiniger et al., 2007). En nous intéressant à l'impact éventuel d'une stimulation par cette bactérie sur l'expression de miR-199a-3p, nous avons décidé d'utiliser une stimulation par cette bactérie morte pour s'abstraire de la spécificité des différents facteurs de virulence par rapport à notre modèle cellulaire et ne s'intéresser qu'à l'impact de la bactérie globale. Nous avons mis en évidence que l'utilisation d'une souche de *P. aeruginosa* morte permettait bien d'induire une inflammation, par l'augmentation de l'expression et la sécrétion en IL-8 et diminuait de manière significative l'expression de miR-199a-3p et par conséquent favorisait l'activation de la voie NF-κB.

Nos résultats sont en contradiction avec ceux retrouvés dans une étude montrant une surexpression de miR-199a-3p dans des LBA pouvant s'expliquer par une infection bactérienne (Oglesby et al., 2010).

On estime, actuellement que plus de 60 % des gènes codant pour une protéine sont régulés par les miARN (Friedman et al., 2009). Toute la complexité de l'interaction entre un miARN et un ARNm se retrouve dans le fait qu'un miARN peut réguler plusieurs ARNm, et un ARNm peut être régulé par plusieurs miARN. De plus, l'expression d'un miARN peut varier d'un type cellulaire à l'autre et en fonction des conditions cellulaires dans lesquelles il se trouve. Aussi retrouver une expression augmentée de miR199a-3p dans des LBA contenant principalement des PNN, des macrophages, des lymphocytes et peu de cellules épithéliales suite à une stimulation par du LPS de *P. aeruginosa* et une expression diminuée dans notre modèle de cellules CF suite à une stimulation par *P. aeruginosa* entière morte reste plausible.

Dans notre contexte, le lien entre la dysfonction de CFTR, le calcium et la voie NF-κB et notre miR-199a-3p, notamment pour expliquer l'origine de sa dérégulation, parait le plus évident. Cependant des études récentes, ont montré que la variation de l'expression du miR-199a-3p pouvait être due à une modulation de la méthylation du promoteur de ce miARN, qui a été retrouvé hyperméthylé dans des cellules ovariennes cancéreuses (Deng et al., 2017). Le locus miR-199A2 est soumis à une régulation épigénétique dans un modèle de mélanome métastatique et est réactivé par une déméthylation de son promoteur (Desjobert et al., 2019).

D'autres études se sont focalisées sur le lien/l'interaction possible entre le miR-199a-3p et des lncRNA (long non-coding RNA). Le miR-199a-3p a été montré comme étant régulé par *SNHG1* (*Small Nucleolar RNA Host Gene 1*) lnc de manière négative, ce qui promeut la prolifération cellulaire dans le cancer de la prostate (Li et al., 2017).

Le lnc *NORAD* (*Noncoding RNA activated by DNA damage*) jouant un rôle dans la régulation des fonctions cellulaires dans le contexte de l'ostéosacrome est capable d'entrer en compétition avec le miR-199a-3p (Wang et al., 2019b).

Aussi bien que nous ayons montré qu'une variation de flux calcique entraînait une modulation de l'expression de miR-199a-3p *via* le pre-miR-199a-1, il serait intéressant de voir quel est l'état de la méthylation du promoteur mais aussi s'il existe un lnc dont l'expression est liée et dérégulée dans le contexte de la mucoviscidose.

III. Interaction entre les miARN

La complexité des pathologies serait illustrée par une dérégulation de l'expression de plusieurs miARN plutôt que d'un seul ce qui est souvent montré dans la littérature (figure 60).

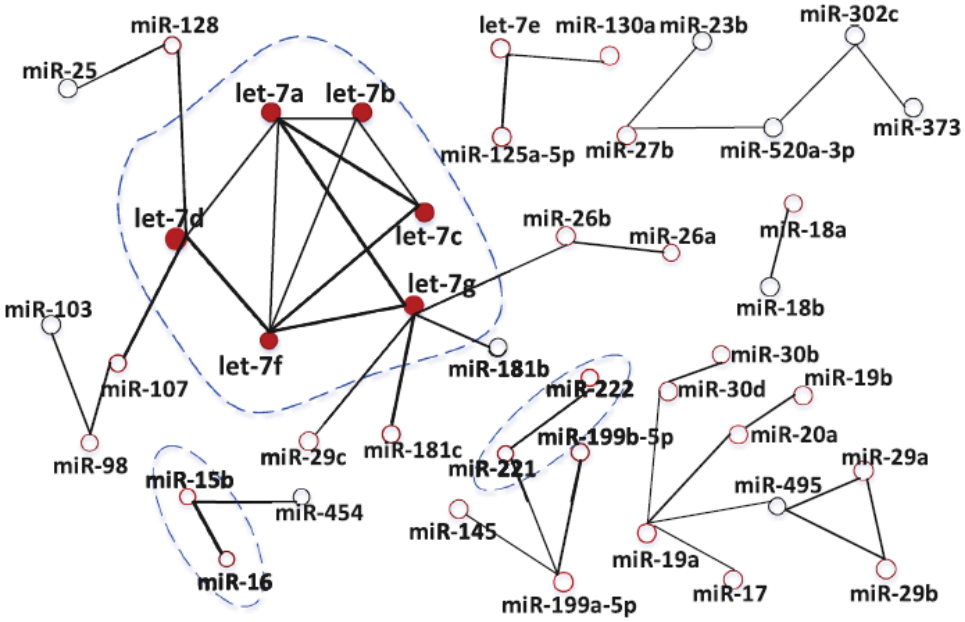


Figure 60 : Exemple de réseau de co-régulation de miARN-miARN. Il existe 41 connexions et 43 nœuds dans ce réseau. Un nœud représente un miARN et une arrête reliant deux nœuds représente une co-régulation. Il a été confirmé que les miARN comportant des cercles rouges (points) sont associés au cancer du poumon dans la base miR2Diseasesdatabase. Les paires vérifiées de co-régulateurs miARN sont mises en évidence dans les cercles bleus en pointillés (Song et al., 2015).

Aussi de façon tout à fait originale et en parallèle de l'étude sur la dérégulation de l'expression de miR-199a-3p, nous voulions déterminer si un miARN pouvait en être à l'origine. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au couple miR-199a-3p/ miR-9-5p, l'un pouvant cibler IKKβ et l'autre la sous-unité NFκB1 du complexe NF-κB, du même nom de la voie de signalisation (Guo et al., 2009).

Nous avons observé qu'une surexpression de miR-199a-3p permettait d'augmenter significativement l'expression de miR-9-5p mais pas inversement alors qu'il n'existe aucun lien au niveau génique. Par la suite, pour déterminer si cette interaction était miR-9-5p dépendante ou miARN dépendante, nous avons testé le couple miR-199a-3p/ miR-636. De manière étonnante lorsque l'on surexprime l'un de ces miARN, l'expression de l'autre augmente aussi. Il semblerait donc qu'il existe une interaction réciproque entre miR-199a-3p et miR-636 et une interaction simple de miR-199a-3p sur miR-9-5p. Le test du couple miR-636/ miR-9-5p n'a montré aucune relation entre ces deux miARN (figure 61).

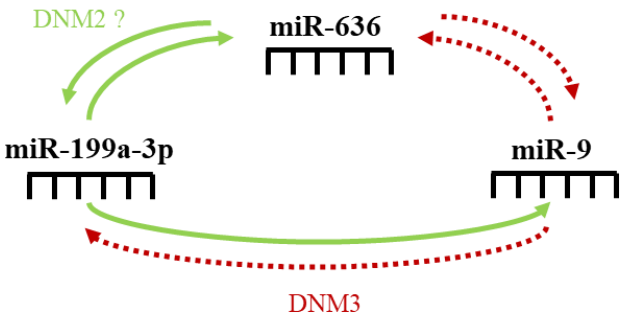


Figure 61 : Lien entre les miR-199a-3p, 636 et 9 dans des cellules CF (CFBE41o-).

Une hypothèse selon laquelle, les pathologies seraient affectées par l'expression de plusieurs miARN dérégulés plutôt qu'un seul miARN a émergé (Xu et al., 2017). Par exemple, les miR-21, miR-23a et miR-27a agissent comme des répresseurs coopératifs de trois gènes suppresseurs de tumeur bien connus dont l'effet répresseur est plus fort avec la combinaison des miARN plutôt qu'un miARN seul (Frampton et al., 2014). Les miARN peuvent agir ensemble, pour promouvoir la progression d'une tumeur par exemple, et par conséquent les stratégies thérapeutiques doivent requérir l'inhibition ou la surexpression de plusieurs miARN (Chen et al., 2015)

Pour vérifier si cette interaction pouvait être due au fait que les miARN sont liés à la voie NF-κB, nous avons mesuré l'expression de miR-144, un miARN n'ayant pas de lien direct avec cette voie, suite à la surexpression de chacun des trois miARN. Nous n'avons observé aucune différence.

L'utilisation des bases de données *Gene* de Pubmed et *e!Ensembl*, nous a permis de mettre en évidence que le miR-199a-3p pouvait être synthétisé par deux gènes. Le pre-miR-199a-1, lié à la dynamine 2 possèderait des sites de fixation pour le miR-636 (1/4 bases de prédiction d'après miRWalk) et le pre-miR-199a-2, lié à la dynamine 3 possèderait des sites de fixation pour le miR-9-5p (3/4 bases de prédiction d'après miRWalk). Nous avons montré qu'en surexprimant miR-9-5p, il n'y avait aucune modulation de l'expression de miR-199a-3p, ni de *DNM3*. Concernant les trois gènes synthétisant miR-9-5p, il n'y a pas de site de fixation de miARN à proximité, et plusieurs gènes sont présents mais non connus et éloignés.

Pour le miR-636, synthétisé par un seul gène, nous n'avons trouvé aucune piste exploitable. Nous aurions pu spéculer qu'une séquence de l'un pouvait être détectée par la sonde qPCR de l'autre. Pourtant au vu des séquences, cela semble peu probable.

Bien que l'on ne sache pas encore comment interagissent ces miARN, nous avons montré qu'il existait un lien entre miR-199a-3p et miR-9-5p ; miR-199a-3p et miR-636, chaque miARN étant capable d'influencer l'expression d'un autre. Ces miARN seuls, ont un rôle de régulateur négatif de la voie NF-κB, mais en combinaison nous n'avons pas observé d'effet synergique de deux miARN ensemble. Cependant, nos miARN sont généralement utilisés à la concentration de 30 nM seul. Pour la combinaison, nous avons abaissé la concentration à 15 nM pour avoir une concentration finale de 30 nM mais peut-être faudrait-il les utiliser respectivement à 30 nM et prendre un mimic contrôle à 60 nM. De plus, lors de la transfection nous utilisons un agent de transfection, le *HiPerfect* et un mimic entraîne souvent une augmentation d'environ x 1 000, aussi peut-être que l'utilisation d'une combinaison des miARN avec ces paramètres pourrait provoquer un stress cellulaire ou une inflammation qui pourrait cacher les effets synergiques de la combinaison des mimic de miARN.

La combinaison de plusieurs miARN peut entraîner un effet synergique sur une cible commune, comme cela a été montré pour la combinaison des miR-124 et let-7b (Krek et al., 2005) ou la combinaison des miR-126, miR-34a et miR-106b sur l'arrêt du cycle cellulaire (Vella et al., 2004). En effet, la combinaison de ces trois miARN entraîne un plus fort arrêt du cycle cellulaire comparé à l'utilisation seule de chacun des miARN. Les miARN peuvent agir de manière combinée et coopérative. De plus, une étude a montré que la combinaison de six miARN pouvait réguler la télomérase et TCF7, un régulateur de transcription de la voie Wnt (Hrdlickova et al., 2014). Les méthodes les plus communes pour étudier les interactions miARN-miARN pouvant s'appliquer à notre contexte sont (Xu et al., 2017) :

- Complémentarité de séquence complète entre les deux miARN
- Interaction au niveau de la chromatine
- Partage de gènes cibles
- Régulation de gènes cibles similaires
- Régulation d'une liste de gènes
- Une similarité de fonction mesurée par la proportion de gènes cibles communs
- Similarité sémantique GO (*Gene Ontology*) des gènes cibles
- Co-fonctionnellement enrichi en termes de GO
- Site d'accessibilité et topologie des gènes cibles

Pour la suite de ce projet, les méthodes listées ci-dessus seront à prendre en considération en plus des expériences déjà effectuées.

L'augmentation de l'expression de miR-9-5p a été montrée comme étant liée à l'expression d'un canal Cl^- calcium dépendant : ANO1 dans le contexte CF (Sonneville et al., 2017). Puisque la surexpression du miR-199a-3p est capable d'augmenter l'expression de miR-9-5p, il serait intéressant de voir quelles seraient les conséquences d'une surexpression de miR-199a-3p sur l'expression et l'activité de ce canal ANO1.

La combinaison de deux miARN n'a pas entraîné de diminution plus importante de l'activité de la voie NF-κB et de la sécrétion en IL-8 mais peut-être que la combinaison des trois miARN le pourrait. De par les effets inhibiteurs de miR-9-5p sur ANO1, si cette tri-combinaison devait être considérée en thérapeutique, il faudrait la coupler à l'utilisation du TSB ANO1 (Sonneville et al., 2017).

IV. Rôle de miR-636 sur l'inflammation

Les premiers articles faisant état d'une dérégulation de l'expression de miR-636 datent de 2011 (Erdogan et al., 2011; Tessel et al., 2011). Dans la plupart des études, de 2011 à nos jours, à notre connaissance seule l'observation d'une dérégulation de son expression dans divers contextes pathologiques a été recensée : syndrome myélodysplasique (Erdogan et al., 2011), fractures ostéoporeuses (Garmilla-Ezquerra et al., 2015), sténose aortique (Shi et al., 2016), cardiomyopathie dilatée (Miyamoto et al., 2015), tumeur colorectale (Slattery et al., 2016), adénocarcinome du colon (Yan et al., 2018), carcinome urothélial des patients hémodialysés chroniques (Chen et al., 2019), néphropathie diabétique (Wang et al., 2019a) et cancer du sein (Encarnacion-Medina et al., 2019) mais aucune relative à la mucoviscidose. Seul le lien direct entre ce miARN et l'une de ces cibles prédites le GRα (*Glucocorticoid Receptor alpha*) au niveau de la région 3'-UTR a été reporté (Tessel et al., 2011). Aussi son expression est associée à divers processus cellulaires tels que la survie, la prolifération, l'inflammation et la réparation de l'ADN.

Notre étude a permis de valider les résultats retrouvés dans le *small RNAseq* publié en 2018, à savoir une surexpression de miR-636 dans des cellules épithéliales bronchiques cultivées en interface air-liquide issues de patients CF par rapport à des sujets sains. Nous n'avons pas observé de différence significative concernant *IL1R1*, *RANK* et *IKBKB* au niveau des expressions en ARNm dans ces mêmes cultures, comme dans les résultats du *RNAseq*. Probablement parce que c'est l'expression protéique qui est dérégulée et non directement l'expression en ARNm. En mesurant, l'expression des différentes cibles dans des explants bronchiques issus de patients CF et non-CF, nous avons montré qu'il semblait y avoir une augmentation de l'expression de miR-636, que l'expression d'*IL1R1* était significativement diminuée, celles de *RANK*, *IKBKB*, *FAM13A* et *IL-8* étaient significativement augmentées et celle de l'*IL-6* semble être diminuée dans les explants bronchiques des patients CF par rapport aux sujets sains.

Pour identifier des cibles spécifiques, nous avons utilisé les bases de prédictions bio-informatiques pour prédire les cibles de miR-636 en lien avec l'inflammation et quatre acteurs sont ressortis : IL1R1, RANK, IKBKB et FAM13A. Nous avons donc focalisé notre étude sur ces quatre potentielles cibles avec une analyse fonctionnelle et avons montré que le miR-636 liait spécifiquement la région 3'-UTR d'*IL1R1, RANK, IKBKB* mais pas celle de *FAM13A* dans le contexte CF. Cette interaction entraîne une diminution de l'expression des protéines ILR1 et IKKβ et augmente l'expression de la protéine RANK après une surexpression de miR 636. De plus, la surexpression de miR-636 provoque une diminution significative de l'activation de la voie NF-κB, de la sécrétion en IL-8 et IL-6, les paramètres principalement dérégulés dans les VA CF.

Comme beaucoup de miARN, l'origine de la dérégulation de l'expression de miR-636 dans le contexte CF n'est pas connue. Dans d'autres contextes pathologiques, un lien a été montré avec ANT2 (*Adenine Nucleotide Translocator 2*). ANT2 est un membre de la famille des transporteurs mitochondriaux contribuant à la translocation de l'ADP du cytoplasme dans la matrice mitochondriale et inversement pour l'ATP. Il a été démontré que la suppression de ce gène induisait l'apoptose et inhibait la croissance tumorale. En effet, une diminution de l'expression de miR-636 est associée à la prolifération cellulaire à travers une augmentation de l'expression de Ras, une des cibles putatives de ce miARN. En outre, la suppression d'ANT2 restaure l'expression du miR-636 permettant ainsi de diminuer l'expression de Ras et d'inhiber la prolifération cellulaire (Jang et al., 2013) et cela *via* la voie PI3K/Akt (Baik et al., 2016). De plus, la diminution de miR-636 est aussi impliquée dans la récupération d'une insuffisance cardiaque due à une cardiomyopathie dilatée (Miyamoto et al., 2015) et dans les progéniteurs cellulaires endothéliaux humains, le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) augmente aussi l'expression du miR-636 (He et al., 2018). De manière intéressante, le miR-636 peut donc avoir d'autres effets biologiques. Le miR-636 circulant est impliqué dans l'élimination du virus de l'hépatite C mais aussi dans la régénération hépatique. Le miR-636 pourrait être l'une des cibles chez les patients HCV qui suivent un traitement antiviral mais qui souffrent toujours d'une infection persistante (Morishita et al., 2018).
Une autre hypothèse de la dérégulation de l'expression de miR-636 pourrait être la modulation de la méthylation du gène le synthétisant. En effet, une étude s'intéressant à la méthylation du miR a montré que dans le contexte d'un régime de perte de poids, le miR-636 est hypométhylé et surexprimé chez les patients *high responders* dans les cellules sanguines blanches (Garcia-Lacarte et al., 2018).

L'une des cibles de miR-636, l'IL1R1 partage des cibles en aval communes à TLR4 (Brown et al., 2013). TLR4 joue un rôle pivot dans l'immunité innée de par ses propriétés d'activation des voies de signalisation de l'inflammation (Pal et al., 2012), en réponse à divers pathogènes, incluant les virus, les bactéries et les champignons (Liu et al., 2016).

La voie du TLR4 étant aussi dérégulée dans le contexte de la mucoviscidose (Cohen and Prince, 2012a; Petit-Bertron et al., 2008b), il serait intéressant de voir quel serait l'impact d'une surexpression de miR-636 sur ce co-acteur. La surexpression de miR-636 inhibant l'expression de l'IL1R1 pourrait diminuer l'activation de la voie de signalisation TLR4. TLR4 est en aval de l'IL1R1 et l'inactivation de la voie IL1R1/TLR4 joue un rôle significatif dans l'épilepsie acquise (Iori et al., 2017). L'activation de TLR4 prévient la translocation de l'IRF3 et donc la synthèse de gènes comme l'*IFN1*, requis pour l'activation des cellules dendritiques et la clairance des pathogènes de la mucoviscidose (Cohen and Prince, 2012a). Le gène *IL1R1* encodant le récepteur dont l'activation est faite par la liaison d'un ligand spécifique entraîne l'activation de la voie NF-κB, qui est largement connu comme modulateur de l'expression des gènes inflammatoires et immuns (Bonizzi and Karin, 2004; DiMango et al., 1998; Tabary et al., 1999b; Verhaeghe et al., 2007b). Il a également été démontré que l'activation de NF-κB par TLR4 augmente rapidement l'expression de miR-9-5p qui fonctionne dans les réponses dépendantes de NF-κB en ajustant avec précision l'expression d'un membre clé de cette famille (Bazzoni et al., 2009). Ensemble, ces données révèlent que la régulation des protéines semble être très complexe avec de nombreux paramètres non élucidés encore. La régulation est étroitement contrôlée par des facteurs de transcription mais également par des miARN.

D'autres études ont montré qu'une surexpression de miR-199b diminuait les expressions d'IKKβ-NF-κB, TNF-α et IL-1β en cas de lésion médullaire aiguë (Zhou et al., 2016). Or le miR-199b est une isoforme avec une séquence identique au miR-199a-3p (Dabbah et al., 2017). Dans le contexte de la mucoviscidose, il a été montré que le miR-199a-3p diminuait l'expression d'IKKβ, par conséquent l'activation de la voie NF-κB et la sécrétion d'IL-8 (Bardin et al., 2018a). Ici, nous avons montré des résultats similaires, entre la surexpression de miR-636 et la diminution de l'expression d'IKKβ-NF-κB.

Le TNF-α active les voies de l'inflammation en se fixant sur des récepteurs TNF tels que le TNFRSF11A, aussi appelé RANK, dans le contexte de la mucoviscidose. Nous avons montré que le miR-636 liait spécifiquement *RANK* à sa région 3'-UTR et régulait donc son expression protéique. RANK agit comme un régulateur essentiel dans l'ostéoclastogenèse (Kong et al., 1999; Velard et al., 2015), mais contrôle aussi l'organogenèse des nœuds lymphatiques (Kong et al., 1999), le développement intestinal (Knoop et al., 2009), les cellules épithéliales médullaires thymiques (Rossi et al., 2007) ou encore la lactation des glandes mammaires pendant la grossesse (Fata et al., 2000).
Mais récemment, une équipe a montré son implication dans les cellules pulmonaires cancéreuses (Rao et al., 2017), illustrant un lien avec les poumons. Notre étude a permis de mettre en relief, une expression différentiellement augmentée dans les explants bronchiques des patients CF de RANK et la régulation de son expression protéique par le miR-636 dans des cellules CF. Nous montrons donc pour la première fois une régulation directe de RANK au niveau pulmonaire par un miARN.

Comme nos résultats le démontrent, la surexpression de miR-636 entraîne une diminution significative de l'activation de la voie NF-κB dans des cellules épithéliales CF. Pourtant nous avons aussi montré que cette surexpression du miR-636 était bien retrouvée dans le *small RNAseq* mais la voie NF-κB, elle, est hyper-activée dans le contexte de la mucoviscidose. Aussi, nous émettons l'hypothèse qu'il existerait dans la cellule un lnc RNA qui pourrait bloquer l'action du miR-636 sur ces différentes cibles. Pour cela, il existe une base de données pour prédire l'interaction entre un miARN et un lncARN (Furio-Tari et al., 2016) que nous utiliserons pour déterminer, dans le contexte de la mucoviscidose, quel lncRNA serait surexprimé et capable de bloquer l'expression de miR-636. Une meilleure connaissance de miR-636 nous permettra de considérer ce miARN comme potentielle cible thérapeutique de l'inflammation chez les patients CF.

Nous avons aussi montré que dans notre modèle cellulaire, une infection par *P. aeruginosa*, le pathogène le plus fréquemment retrouvé dans les VA des patients CF, mort à une MOI de 0.25 pendant 24 h n'entraînait aucune variation de l'expression de miR-636, *IL1R1, RANK* et *IKBKB*. Nous avions choisi un temps long pour voir un possible impact sur l'expression de notre miARN comme nous l'avions fait pour le miR-199a-3p mais il est possible que celui-ci soit trop long pour observer un impact sur les expressions en ARNm. Il faudrait envisager de regarder les expressions protéiques d'IL1R1, RANK et IKKβ pour voir un potentiel effet de la stimulation infectieuse ou non.

Dans cet article, nos résultats suggèrent que miR-636 pourrait être considéré comme un biomarqueur des patients atteints de mucoviscidose dans les PNN mais pas dans le plasma. En combinaison avec d'autres miARN (miR-150, miR-145 et miR-223), le miR-636 pourrait servir de biomarqueur dans le sang comme cela a été montré précédemment (Schultz et al., 2014) et de biomarqueur de pathologie comme la pathologie rénale associée au diabète, puisque le miR-636 est exprimé dans des exosomes présents dans l'urine des patients (Eissa et al., 2016). Il serait intéressant dans notre contexte de mesurer les expressions des miR-150, miR-145 and miR-223 dans les plasmas des patients CF et des sujets sains non-CF, comme nous l'avons fait pour miR-636. Dans le contexte de la prostate, la diminution de l'expression de miR-636 permettrait de le définir en tant que marqueur candidat prédictif (Pashaei et al., 2017). Nous avons montré que l'expression de miR-636 semblait être augmentée dans les plasmas des patients CF et l'était significativement dans les PNN sanguins des patients CF par rapport aux sujets sains.
Il est probable qu'en combinaison avec d'autres miARN, le miR-636 pourrait être un biomarqueur de l'inflammation chez les patients CF comme cela a été effectué précédemment dans le plasma (Cook et al., 2015; Schultz et al., 2014) et dans les PNN (Huang et al., 2018).

V. MiARN : biomarqueurs

Des biomarqueurs permettant d'améliorer le dépistage, le diagnostic, le pronostic ou d'appréhender la réponse des patients de manière individuelle à un traitement donné sont un enjeu actuel dans tous les domaines de la médecine moderne. Un biomarqueur doit être fiable, sensible et peu invasif. Les miARN sont stables dans le sérum ou le plasma malgré la présence de ribonucléases dans le sang et peuvent résister à une digestion par de la RNase A, à de nombreux cycles de congélation/décongélation et sont insensibles aux modifications de pH (Chen et al., 2008b; Mitchell et al., 2008).

La caractérisation des miARN pourrait aider à l'établissement d'un diagnostic ou d'un pronostic, basé sur le postulat qu'un miARN spécifique d'une pathologie pourrait être identifié dans les fluides extracellulaires corporels, comme le sérum, le plasma ou la salive, comme potentiels biomarqueurs (Cook et al., 2015; Hu et al., 2014; Llano-Diez et al., 2017; Waller et al., 2017) du fait de leur stabilité (Chen et al., 2008b; El-Hefnawy et al., 2004) mais aussi dans certains types cellulaires comme les PNN.

Il a par exemple été montré que l'augmentation de l'expression de certains miARN peut aussi corréler avec la fonction respiratoire des patients, comme pour le miR-199a-5p dont les niveaux dans des PNN de patients asthmatiques corrèlent avec la fonction respiratoire (Huang et al., 2018). De plus, chez des patients atteints de gliome, il a été montré une sous-expression significative de miR-199a-3p dans des plasmas, permettant d'envisager sa mesure pour le diagnostic et le pronostic de cette pathologie (Chai et al., 2016).

Dans l'objectif d'identifier si nos trois miARN : miR-199a-3p, miR-636 et miR-9-5p pouvaient être de potentiels biomarqueurs, tant au niveau plasmatique que neutrophile, nous avons mesuré leur expression dans des plasmas et des PNN issus de patients CF et non-CF. Nous avons montré que l'hétérogénéité de l'expression des trois miARN retrouvée dans les plasmas des patients CF et sujets sains non-CF n'est plus retrouvée lorsque les échantillons sont non hémolysés. Cette hétérogénéité ne serait donc pas due à une variabilité phénotypique interindividuelle mais à l'hémolyse des échantillons. Cela nous a permis de mettre en évidence une diminution de l'expression significative de miR-199a-3p dans les plasmas des patients CF par rapport aux patients non-CF. Mais toujours aucune différence n'a été recensée pour miR-636 et miR-9-5p. Peut-être que la combinaison de ces deux miARN pourrait montrer une différence entre les deux groupes.

De manière opposée, dans les PNN sanguins, l'expression de miR-199a-3p n'est pas significativement modulée, mais celles de miR-636 et miR-9-5p sont significativement augmentées chez les patients CF par rapport aux patients non-CF.

Concernant le miR-199a-3p, il avait été montré qu'il pouvait servir de biomarqueur plasmatique dans le pronostic et le diagnostic du gliome (Chai et al., 2016). Au vu des résultats, nous voulions corréler l'état inflammatoire des patients avec l'expression des différents miARN (plasma : miR-199a-3p et PNN sanguins : miR-636 et miR-9-5p) mais nous ne possédons pas toutes les données cliniques des patients pour effectuer ce lien. Il serait donc intéressant de développer ce projet en incluant de nouveaux échantillons de patients pour lesquels nous aurions toutes les caractéristiques médicales. Le but étant de pouvoir corréler l'expression des différents miARN avec l'état inflammatoire du patient : période d'exacerbation, infection, VEMS.

L'objectif à long terme serait de pouvoir mettre au point un test utilisant la signature de ces miARN comme cela a été fait par la société *Rosetta Genomics*, sous le nom de *miRview*, pour diagnostiquer les quatre principales classes de cancer du poumon à partir d'une biopsie avec une précision de 94 % (Gilad et al., 2012), pour pouvoir prédire une période d'exacerbation et pouvoir mieux la réguler chez le patient CF.

VI. *SmallRNAseq* & *RNAseq* - Vertex®

Dans une étude pilote effectuée précédemment (n=3) au laboratoire, nous avions observé que l'Orkambi® (Vx-809/Vx-770) semblait induire des modifications majeures de l'expression des miARN et ARN. Cette molécule aurait donc des actions sur d'autres gènes que sur *CFTR* et induirait des variations importantes dans l'expression des miARN.

Nous avons donc effectué un nouveau *small RNAseq* sur des cultures primaires de patients CF de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide (n=5) commandées chez Epithelix.

Elles ont été traitées par Vx-809/Vx-770 pendant 24 h (en comparaison avec ces mêmes cellules non traitées) et en effectuant en parallèle un *RNAseq*. Les miARN et ARN extraits ont été envoyés à la plateforme de séquençage IPBMC de Nice. Les données brutes ont été analysées par les bio-informaticiens et bio-statisticiens de la plate-forme.

Sur les cinq échantillons envoyés, et passés au *RNAseq* et *small RNAseq*, seuls quatre ont finalement été conservés pour l'analyse. En effet, sur les cinq échantillons, il y avait un échantillon venant d'un homme et quatre venant de femmes. Il a été rapporté que l'échantillon masculin amenait les gènes des chromosomes X/Y à apparaître comme étant exprimés de manière différentielle et a donc été enlevé pour la suite de l'analyse des données.

Les résultats du *RNAseq* ont montré une expression différentielle de 27 ARN entre les cellules CF ± Vx-809/Vx-770 dont 12 significativement sous-exprimés (log2FC < 0.5), 1 significativement surexprimé (log2FC > 2) et 4 à la limite de la significativité. Parmi ces gènes, on retrouve plusieurs acteurs impliqués dans l'inflammation et l'immunité innée, dans la régulation de canaux ou de transporteurs, dans la réponse anti-infectieuse, dans les processus de développement ou encore dans le métabolisme. De ce fait, et bien qu'il reste à effectuer les validations fonctionnelles de ces différentes cibles, il semblerait que l'utilisation de la combinaison des molécules Vx-809/Vx-770 chez les patients CF provoque, en plus de son effet bénéfique sur le ré-adressage et la potentialisation du canal CFTR, des dérèglements cellulaires, immunitaires et métaboliques importants.

Par exemple, le gène *SLC6A14*, identifié comme gène modificateur de la mucoviscidose (Gong et al., 2019; Sun et al., 2012), possède des loci associés à la modification de l'obstruction intestinale néonatale et à des différences dans l'atteinte pulmonaire en fonction des variants. Le gène *CXCL6*, codant pour la chimiokine 6, joue un rôle de chémoattraction des granulocytes neutrophiles et aurait une activité antibactérienne contre les bactéries gram + et -. Le gène *S100A9* a été montré comme étant lié aux voies PI3K/Akt, ERK1/2 et favorisant la production de MUC5AC dans des cellules épithéliales pulmonaires *via* le facteur NF-κB (Kang et al., 2015). De plus, son expression est inductible par le LPS dans des cellules épithéliales bronchiques (Henke et al., 2006). Complexé à *S100A8* (dérégulé aussi dans notre *RNAseq*), il forme la calprotectine, un complexe protéique inflammatoire de neutrophiles ayant une large activité induisant l'apoptose (Yui et al., 2003). Les 3 gènes évoqués précédemment pourraient être nos futures cibles d'études. Le seul gène significativement surexprimé, *SBSN* (*Suprabasin*), est impliqué quant à lui dans la perméabilité veineuse périphérique (Kenagy et al., 2016).

De manière étonnante, les résultats du *small RNAseq* n'ont montré aucune différence entre les cellules CF ± Vx-809/Vx-770 avec nos critères d'analyses, à savoir : surexpression si log2FC > 2 ; sous-expression log2FC < 0.5.

BIBLIOGRAPHIE

Adib-Conquy, M., T. Pedron, A.F. Petit-Bertron, O. Tabary, H. Corvol, J. Jacquot, A. Clement, and J.M. Cavaillon. 2008. Neutrophils in cystic fibrosis display a distinct gene expression pattern. *Mol Med*. 14:36-44.

Agarwal, V., G.W. Bell, J.W. Nam, and D.P. Bartel. 2015. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 4.

Alshafie, W., F.G. Chappe, M. Li, Y. Anini, and V.M. Chappe. 2014. VIP regulates CFTR membrane expression and function in Calu-3 cells by increasing its interaction with NHERF1 and P-ERM in a VPAC1- and PKCepsilon-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol*. 307:C107-119.

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

Alton, E.W., A.C. Boyd, J.C. Davies, D.R. Gill, U. Griesenbach, P.T. Harrison, N. Henig, T. Higgins, S.C. Hyde, J.A. Innes, and M.S. Korman. 2016. Genetic medicines for CF: Hype versus reality. *Pediatr Pulmonol*. 51:S5-S17.

Amaral, M.D., and C.M. Farinha. 2013. Rescuing mutant CFTR: a multi-task approach to a better outcome in treating cystic fibrosis. *Curr Pharm Des*. 19:3497-3508.

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

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

Ameres, S.L., and P.D. Zamore. 2013. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14:475-488.

Andersen, D.H. 1938. CYSTIC FIBROSIS OF THE PANCREAS AND ITS RELATION TO CELIAC DISEASE. *Am J Dis Child*. 26:344-399.

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

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

Antigny, F., C. Norez, F. Becq, and C. Vandebrouck. 2008a. Calcium homeostasis is abnormal in cystic fibrosis airway epithelial cells but is normalized after rescue of F508del-CFTR. *Cell Calcium*. 43:175-183.

Antigny, F., C. Norez, A. Cantereau, F. Becq, and C. Vandebrouck. 2008b. Abnormal spatial diffusion of Ca2+ in F508del-CFTR airway epithelial cells. *Respir Res*. 9:70.

Antunes, K.A., M.M. Morales, P. Pelosi, P. Rieken, and M. Rocco. 2013. Lung Resident Stem Cells. *Resident Stem Cells and Regenerative Therapy*:105-122.

Armstrong, D.S., K. Grimwood, J.B. Carlin, R. Carzino, J.P. Gutierrez, J. Hull, A. Olinsky, E.M. Phelan, C.F. Robertson, and P.D. Phelan. 1997. Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 156:1197-1204.

Arroyo, J.D., J.R. Chevillet, E.M. Kroh, I.K. Ruf, C.C. Pritchard, D.F. Gibson, P.S. Mitchell, C.F. Bennett, E.L. Pogosova-Agadjanyan, D.L. Stirewalt, J.F. Tait, and M. Tewari. 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:5003-5008.

Bader, A.G. 2012. miR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front Genet*. 3:120.

Baek, D., J. Villen, C. Shin, F.D. Camargo, S.P. Gygi, and D.P. Bartel. 2008. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 455:64-71.

Baeuerle, P.A., and T. Henkel. 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 12:141-179.

Baik, S.H., J. Lee, Y.S. Lee, J.Y. Jang, and C.W. Kim. 2016. ANT2 shRNA downregulates miR-19a and miR-96 through the PI3K/Akt pathway and suppresses tumor growth in hepatocellular carcinoma cells. *Exp Mol Med*. 48:e222.

Bajan, S., and G. Hutvagner. 2014. Regulation of miRNA processing and miRNA mediated gene repression in cancer. *Microrna*. 3:10-17.

Balfour-Lynn, I.M., A. Laverty, and R. Dinwiddie. 1996. Reduced upper airway nitric oxide in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 75:319-322.

Balough, K., M. McCubbin, M. Weinberger, W. Smits, R. Ahrens, and R. Fick. 1995. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 20:63-70.

Bardin, P., E. Marchal-Duval, F. Sonneville, S. Blouquit-Laye, N. Rousselet, P. Le Rouzic, H. Corvol, and O. Tabary. 2018a. Small RNA and transcriptome sequencing reveal the role of miR-199a-3p in inflammatory processes in cystic fibrosis airways. *J Pathol*.

Bardin, P., F. Sonneville, H. Corvol, and O. Tabary. 2018b. Emerging microRNA Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. *Frontiers in pharmacology*. 9:1113.

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

Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116:281-297.

Bartel, D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 136:215-233.

Bartoszewski, R., A. Rab, A. Jurkuvenaite, M. Mazur, J. Wakefield, J.F. Collawn, and Z. Bebok. 2008. Activation of the unfolded protein response by deltaF508 CFTR. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 39:448-457.

Basbaum, C.B., B. Jany, and W.E. Finkbeiner. 1990. The serous cell. *Annu Rev Physiol*. 52:97-113.

Basu, S., and M.J. Fenton. 2004. Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 286:L887-892.

Baulande, S., A. Criqui, and M. Duthieuw. 2014. [Circulating miRNAs as a new class of biomedical markers]. *Med Sci (Paris)*. 30:289-296.

Bazzoni, F., M. Rossato, M. Fabbri, D. Gaudiosi, M. Mirolo, L. Mori, N. Tamassia, A. Mantovani, M.A. Cassatella, and M. Locati. 2009. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:5282-5287.

Becker, M.N., M.S. Sauer, M.S. Muhlebach, A.J. Hirsh, Q. Wu, M.W. Verghese, and S.H. Randell. 2004. Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 169:645-653.

Beg, M.S., A.J. Brenner, J. Sachdev, M. Borad, Y.K. Kang, J. Stoudemire, S. Smith, A.G. Bader, S. Kim, and D.S. Hong. 2017. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. 35:180-188.

Berger, M. 2002. Inflammatory mediators in cystic fibrosis lung disease. *Allergy Asthma Proc*. 23:19-25.

Berube, K., Z. Prytherch, C. Job, and T. Hughes. 2010. Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models. *Toxicology*. 278:311-318.

Bhattacharyya, S., N.S. Balakathiresan, C. Dalgard, U. Gutti, D. Armistead, C. Jozwik, M. Srivastava, H.B. Pollard, and R. Biswas. 2011. Elevated miR-155 promotes inflammation in cystic fibrosis by driving hyperexpression of interleukin-8. *J Biol Chem*. 286:11604-11615.

Bhattacharyya, S., P. Kumar, M. Tsuchiya, A. Bhattacharyya, and R. Biswas. 2013. Regulation of miR-155 biogenesis in cystic fibrosis lung epithelial cells: antagonistic role of two mRNA-destabilizing proteins, KSRP and TTP. *Biochem Biophys Res Commun*. 433:484-488.

Bhattacharyya, S.N., R. Habermacher, U. Martine, E.I. Closs, and W. Filipowicz. 2006. Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 71:513-521.

Blau, H., K. Klein, I. Shalit, D. Halperin, and I. Fabian. 2007. Moxifloxacin but not ciprofloxacin or azithromycin selectively inhibits IL-8, IL-6, ERK1/2, JNK, and NF-kappaB activation in a cystic fibrosis epithelial cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 292:L343-352.

Bobadilla, J.L., M. Macek, Jr., J.P. Fine, and P.M. Farrell. 2002. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*. 19:575-606.

Bodas, M., and N. Vij. 2010. The NF-kappaB signaling in cystic fibrosis lung disease: pathophysiology and therapeutic potential. *Discov Med*. 9:346-356.

Boelle, P.Y., D. Debray, L. Guillot, A. Clement, H. Corvol, and C.F.M.G.S.I. French. 2019. Cystic Fibrosis Liver Disease: Outcomes and Risk Factors in a Large Cohort of French Patients. *Hepatology*. 69:1648-1656.

Boncoeur, E., V.S. Criq, E. Bonvin, T. Roque, A. Henrion-Caude, D.C. Gruenert, A. Clement, J. Jacquot, and O. Tabary. 2008a. Oxidative stress induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase in cystic fibrosis lung epithelial cells: Potential mechanism for excessive IL-8 expression. *Int J Biochem Cell Biol*. 40:432-446.

Boncoeur, E., T. Roque, E. Bonvin, V. Saint-Criq, M. Bonora, A. Clement, O. Tabary, A. Henrion-Caude, and J. Jacquot. 2008b. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator controls lung proteasomal degradation and nuclear factor-kappaB activity in conditions of oxidative stress. *Am J Pathol*. 172:1184-1194.

Bonfield, T.L., M.W. Konstan, and M. Berger. 1999. Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 104:72-78.

Bonfield, T.L., M.W. Konstan, P. Burfeind, J.R. Panuska, J.B. Hilliard, and M. Berger. 1995. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti- inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 13:257-261.

Bonizzi, G., and M. Karin. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 25:280-288.

Boucher, R.C. 1994a. Human airway ion transport. Part one. *Am J Respir Crit Care Med*. 150:271-281.

Boucher, R.C. 1994b. Human airway ion transport. Part two. *Am J Respir Crit Care Med*. 150:581-593.

Boucher, R.C. 2002. An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 54:1359-1371.

Boucher, R.C., M.J. Stutts, M.R. Knowles, L. Cantley, and J.T. Gatzy. 1986. Na+ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest*. 78:1245-1252.

Bouchie, A. 2013. First microRNA mimic enters clinic. *Nat Biotechnol*. 31:577.

Bourdelais, A.J., S. Campbell, H. Jacocks, J. Naar, J.L. Wright, J. Carsi, and D.G. Baden. 2004. Brevenal is a natural inhibitor of brevetoxin action in sodium channel receptor binding assays. *Cell Mol Neurobiol*. 24:553-563.

Boyle, M.P., S.C. Bell, M.W. Konstan, S.A. McColley, S.M. Rowe, E. Rietschel, X. Huang, D. Waltz, N.R. Patel, D. Rodman, and V.X.s. group. 2014. A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *The Lancet. Respiratory medicine*. 2:527-538.

Boyle, M.P., and K. De Boeck. 2013. A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *The Lancet. Respiratory medicine*. 1:158-163.

Bozinovski, S., J.E. Jones, R. Vlahos, J.A. Hamilton, and G.P. Anderson. 2002. Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) regulates lung innate immunity to lipopolysaccharide through Akt/Erk activation of NFkappa B and AP-1 in vivo. *J Biol Chem*. 277:42808-42814.

Brown, G.T., P. Narayanan, W. Li, R.L. Silverstein, and T.M. McIntyre. 2013. Lipopolysaccharide stimulates platelets through an IL-1beta autocrine loop. *J Immunol*. 191:5196-5203.

Brown, P.S., C.E. Pope, R.L. Marsh, X. Qin, S. McNamara, R. Gibson, J.L. Burns, G. Deutsch, and L.R. Hoffman. 2014. Directly sampling the lung of a young child with cystic fibrosis reveals diverse microbiota. *Ann Am Thorac Soc*. 11:1049-1055.

Burns, J.L., R.L. Gibson, S. McNamara, D. Yim, J. Emerson, M. Rosenfeld, P. Hiatt, K. McCoy, R. Castile, A.L. Smith, and B.W. Ramsey. 2001. Longitudinal assessment of Pseudomonas aeruginosa in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 183:444-452.

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

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

Cai, Y., R.O. Bak, and J.G. Mikkelsen. 2014. Targeted genome editing by lentiviral protein transduction of zinc-finger and TAL-effector nucleases. *Elife*. 3:e01911.

Callegari, E., L. D'Abundo, P. Guerriero, C. Simioni, B.K. Elamin, M. Russo, A. Cani, C. Bassi, B. Zagatti, L. Giacomelli, S. Blandamura, F. Moshiri, S. Ultimo, A. Frassoldati, G. Altavilla, L. Gramantieri, L.M. Neri, S. Sabbioni, and M. Negrini. 2018. miR-199a-3p Modulates MTOR and PAK4 Pathways and Inhibits Tumor Growth in a Hepatocellular Carcinoma Transgenic Mouse Model. *Mol Ther Nucleic Acids*. 11:485-493.

Calvopina, D.A., M.D. Chatfield, A. Weis, M.A. Coleman, M.A. Fernandez-Rojo, C. Noble, L.E. Ramm, D.H. Leung, P.J. Lewindon, and G.A. Ramm. 2018. MicroRNA Sequencing Identifies a Serum MicroRNA Panel, Which Combined With Aspartate Aminotransferase to Platelet Ratio Index Can Detect and Monitor Liver Disease in Pediatric Cystic Fibrosis. *Hepatology*. 68:2301-2316.

Cantin, A.M., D. Hartl, M.W. Konstan, and J.F. Chmiel. 2015. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros*. 14:419-430.

Carrabino, S., D. Carpani, A. Livraghi, M. Di Cicco, D. Costantini, E. Copreni, C. Colombo, and M. Conese. 2006. Dysregulated interleukin-8 secretion and NF-kappaB activity in human cystic fibrosis nasal epithelial cells. *J Cyst Fibros*.

Carthew, R.W., and E.J. Sontheimer. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 136:642-655.

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

Chai, C., L.J. Song, B. Yang, S.Y. Han, X.Q. Li, and M. Li. 2016. Circulating miR-199a-3p in plasma and its potential diagnostic and prognostic value in glioma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 20:4885-4890.

Chandler, J.D., C. Margaroli, H. Horati, M.B. Kilgore, M. Veltman, H.K. Liu, A.J. Taurone, L. Peng, L. Guglani, K. Uppal, Y.M. Go, H. Tiddens, B.J. Scholte, R. Tirouvanziam, D.P. Jones, and H.M. Janssens. 2018. Myeloperoxidase oxidation of methionine associates with early cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*. 52.

Chandru, H., and V. Boggaram. 2007. The role of sphingosine 1-phosphate in the TNF-alpha induction of IL-8 gene expression in lung epithelial cells. *Gene*. 391:150-160.

Chao, T.S., K.L. Byron, K.M. Lee, M. Villereal, and M.R. Rosner. 1992. Activation of MAP kinases by calcium-dependent and calcium-independent pathways. Stimulation by thapsigargin and epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 267:19876-19883.

Chappe, V., D.A. Hinkson, T. Zhu, X.B. Chang, J.R. Riordan, and J.W. Hanrahan. 2003. Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA. *J Physiol*. 548:39-52.

Chaudhary, N., K. Ueno-Shuto, T. Ono, Y. Ohira, K. Watanabe, A. Nasu, H. Fujikawa, R. Nakashima, N. Takahashi, M.A. Suico, H. Kai, and T. Shuto. 2019. Curcumin Down-Regulates Toll-Like Receptor-2 Gene Expression and Function in Human Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells. *Biol Pharm Bull*. 42:489-495.

Chen, C.L., C.H. Lin, A.L. Li, C.C. Huang, B.Y. Shen, Y.R. Chiang, P.L. Fang, H.C. Chang, K.L. Li, W.C. Yang, J.T. Horng, and N. Ma. 2019. Plasma miRNA profile is a biomarker associated with urothelial carcinoma in chronic hemodialysis patients. *Am J Physiol Renal Physiol*. 316:F1094-F1102.

Chen, H.H., W.T. Huang, L.W. Yang, and C.W. Lin. 2015. The PTEN-AKT-mTOR/RICTOR Pathway in Nasal Natural Killer Cell Lymphoma Is Activated by miR-494-3p via PTEN But Inhibited by miR-142-3p via RICTOR. *Am J Pathol*. 185:1487-1499.

Chen, J.H., D.A. Stoltz, P.H. Karp, S.E. Ernst, A.A. Pezzulo, T.O. Moninger, M.V. Rector, L.R. Reznikov, J.L. Launspach, K. Chaloner, J. Zabner, and M.J. Welsh. 2010. Loss of anion transport without increased sodium absorption characterizes newborn porcine cystic fibrosis airway epithelia. *Cell*. 143:911-923.

Chen, L.W., M.W. Lin, and C.M. Hsu. 2005. Different pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or platelet activating factor in human neutrophils. *J Biomed Sci*. 12:311-319.

Chen, R., A.B. Alvero, D.A. Silasi, M.G. Kelly, S. Fest, I. Visintin, A. Leiser, P.E. Schwartz, T. Rutherford, and G. Mor. 2008a. Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells. *Oncogene*. 27:4712-4723.

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

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

Cheng, S.H., R.J. Gregory, J. Marshall, S. Paul, D.W. Souza, G.A. White, C.R. O'Riordan, and A.E. Smith. 1990. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*. 63:827-834.

Cheon, I.S., S.S. Woo, S.S. Kang, J. Im, C.H. Yun, D.K. Chung, D.K. Park, and S.H. Han. 2008. Peptidoglycan-mediated IL-8 expression in human alveolar type II epithelial cells requires lipid raft formation and MAPK activation. *Mol Immunol*. 45:1665-1673.

Chevalier, B., A. Adamiok, O. Mercey, D.R. Revinski, L.E. Zaragosi, A. Pasini, L. Kodjabachian, P. Barbry, and B. Marcet. 2015. miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nature communications*. 6:8386.

Chirico, V., A. Lacquaniti, S. Leonardi, L. Grasso, N. Rotolo, C. Romano, G. Di Dio, E. Lionetti, A. David, T. Arrigo, C. Salpietro, and M. La Rosa. 2015. Acute pulmonary exacerbation and lung function decline in patients with cystic fibrosis: high-mobility group box 1 (HMGB1) between inflammation and infection. *Clin Microbiol Infect*. 21:368 e361-369.

Chmiel, J.F., M. Berger, and M.W. Konstan. 2002. The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 23:5-27.

Chmiel, J.F., and M.W. Konstan. 2005. Anti-Inflammatory Medications for Cystic Fibrosis Lung Disease: Selecting the Most Appropriate Agent. *Treat Respir Med*. 4:255-273.

Chmiel, J.F., M.W. Konstan, J.E. Knesebeck, J.B. Hilliard, T.L. Bonfield, D.V. Dawson, and M. Berger. 1999. IL-10 attenuates excessive inflammation in chronic Pseudomonas infection in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 160:2040-2047.

Choi, J.G., Y. Dang, S. Abraham, H. Ma, J. Zhang, H. Guo, Y. Cai, J.G. Mikkelsen, H. Wu, P. Shankar, and N. Manjunath. 2016. Lentivirus pre-packed with Cas9 protein for safer gene editing. *Gene Ther*. 23:627-633.

Clancy, J.P., S.M. Rowe, F.J. Accurso, M.L. Aitken, R.S. Amin, M.A. Ashlock, M. Ballmann, M.P. Boyle, I. Bronsveld, P.W. Campbell, K. De Boeck, S.H. Donaldson, H.L. Dorkin, J.M. Dunitz, P.R. Durie, M. Jain, A. Leonard, K.S. McCoy, R.B. Moss, J.M. Pilewski, D.B. Rosenbluth, R.C. Rubenstein, M.S. Schechter, M. Botfield, C.L. Ordonez, G.T. Spencer-Green, L. Vernillet, S. Wisseh, K. Yen, and M.W. Konstan. 2012. Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax*. 67:12-18.

Claustres, M., C. Theze, M. des Georges, D. Baux, E. Girodon, T. Bienvenu, M.P. Audrezet, I. Dugueperoux, C. Ferec, G. Lalau, A. Pagin, A. Kitzis, V. Thoreau, V. Gaston, E. Bieth, M.C. Malinge, M.P. Reboul, P. Fergelot, L. Lemonnier, C. Mekki, P. Fanen, A. Bergougnoux, S. Sasorith, C. Raynal, and C. Bareil. 2017. CFTR-France, a national relational patient database for sharing genetic and phenotypic data associated with rare CFTR variants. *Hum Mutat*. 38:1297-1315.

Coburn, B., P.W. Wang, J. Diaz Caballero, S.T. Clark, V. Brahma, S. Donaldson, Y. Zhang, A. Surendra, Y. Gong, D. Elizabeth Tullis, Y.C. Yau, V.J. Waters, D.M. Hwang, and D.S. Guttman. 2015. Lung microbiota across age and disease stage in cystic fibrosis. *Sci Rep*. 5:10241.

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

Cohen, T.S., and A. Prince. 2012a. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med*. 18:509-519.

Cohen, T.S., and A. Prince. 2012b. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med*. 18:509-519.

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

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, and M.R. Knowles. 2015. Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nature communications*. 6:8382.

Corvol, H., C. Flamant, C. Vallet, A. Clement, and J. Brouard. 2006. [Modifier genes and cystic fibrosis]. *Arch Pediatr*. 13:57-63.

Corvol, H., K.E. Thompson, O. Tabary, P. le Rouzic, and L. Guillot. 2016. Translating the genetics of cystic fibrosis to personalized medicine. *Transl Res*. 168:40-49.

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

Crooke, S.T., S. Wang, T.A. Vickers, W. Shen, and X.H. Liang. 2017. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol*. 35:230-237.

Crosby, J.R., C. Zhao, C. Jiang, D. Bai, M. Katz, S. Greenlee, H. Kawabe, M. McCaleb, D. Rotin, S. Guo, and B.P. Monia. 2017. Inhaled ENaC antisense oligonucleotide ameliorates cystic fibrosis-like lung disease in mice. *J Cyst Fibros*.

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

Dabbah, M., O. Attar-Schneider, V. Zismanov, S. Tartakover Matalon, M. Lishner, and L. Drucker. 2017. Letter to the Editor: miR-199b-3p and miR-199a-3p are isoforms with identical sequence and established function as tumor and metastasis suppressors. *J Leukoc Biol*. 101:1069.

Dai, L., L. Gu, and W. Di. 2012. MiR-199a attenuates endometrial stromal cell invasiveness through suppression of the IKKbeta/NF-kappaB pathway and reduced interleukin-8 expression. *Molecular human reproduction*. 18:136-145.

Dalemans, W., P. Barbry, G. Champigny, S. Jallat, K. Dott, D. Dreyer, R.G. Crystal, A. Pavirani, J.P. Lecocq, and M. Lazdunski. 1991. Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature*. 354:526-528.

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

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

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

Debray, D. 2012. [Cystic fibrosis associated with liver disease]. *Arch Pediatr*. 19 Suppl 1:S23-26.

Delgado, M.A., J.F. Poschet, and V. Deretic. 2006. Nonclassical Pathway of Pseudomonas aeruginosa DNA-Induced Interleukin-8 Secretion in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. *Infect Immun*. 74:2975-2984.

Deng, Y., F. Zhao, L. Hui, X. Li, D. Zhang, W. Lin, Z. Chen, and Y. Ning. 2017. Suppressing miR-199a-3p by promoter methylation contributes to tumor aggressiveness and cisplatin resistance of ovarian cancer through promoting DDR1 expression. *J Ovarian Res*. 10:50.

Denli, A.M., B.B. Tops, R.H. Plasterk, R.F. Ketting, and G.J. Hannon. 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 432:231-235.

Desjobert, C., A. Carrier, A. Delmas, D.M. Marzese, A. Daunay, F. Busato, A. Pillon, J. Tost, J. Riond, G. Favre, C. Etievant, and P.B. Arimondo. 2019. Demethylation by low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine impairs 3D melanoma invasion partially through miR-199a-3p expression revealing the role of this miR in melanoma. *Clin Epigenetics*. 11:9.

Dhooghe, B., S. Noel, F. Huaux, and T. Leal. 2014. Lung inflammation in cystic fibrosis: pathogenesis and novel therapies. *Clin Biochem*. 47:539-546.

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

DiMango, E., A.J. Ratner, R. Bryan, S. Tabibi, and A. Prince. 1998. Activation of NF-kappaB by adherent Pseudomonas aeruginosa in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest*. 101:2598-2605.

Dittrich, A.S., I. Kuhbandner, S. Gehrig, V. Rickert-Zacharias, M. Twigg, S. Wege, C.C. Taggart, F. Herth, C. Schultz, and M.A. Mall. 2018. Elastase activity on sputum neutrophils correlates with severity of lung disease in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 51.

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

Dolmetsch, R.E., K. Xu, and R.S. Lewis. 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*. 392:933-936.

Donaldson, S.H., W.D. Bennett, K.L. Zeman, M.R. Knowles, R. Tarran, and R.C. Boucher. 2006. Mucus clearance and lung function in cystic fibrosis with hypertonic saline. *N Engl J Med*. 354:241-250.

Doring, G., W. Goldstein, K. Botzenhart, A. Kharazmi, P.O. Schiotz, N. Hoiby, and M. Dasgupta. 1986. Elastase from polymorphonuclear leucocytes: a regulatory enzyme in immune complex disease. *Clin Exp Immunol*. 64:597-605.

Downey, D.G., S.C. Bell, and J.S. Elborn. 2009. Neutrophils in cystic fibrosis. *Thorax*. 64:81-88.

Drumm, M.L., M.W. Konstan, M.D. Schluchter, A. Handler, R. Pace, F. Zou, M. Zariwala, D. Fargo, A. Xu, J.M. Dunn, R.J. Darrah, R. Dorfman, A.J. Sandford, M. Corey, J. Zielenski, P. Durie, K. Goddard, J.R. Yankaskas, F.A. Wright, M.R. Knowles, and G. Gene Modifier Study. 2005. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 353:1443-1453.

Dudez, T., F. Borot, S. Huang, B.R. Kwak, M. Bacchetta, M. Ollero, B.A. Stanton, and M. Chanson. 2008. CFTR in a lipid raft-TNFR1 complex modulates gap junctional intercellular communication and IL-8 secretion. *Biochim Biophys Acta*. 1783:779-788.

Dweep, H., C. Sticht, and N. Gretz. 2013. In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions. *Current genomics*. 14:127-136.

Ebert, M.S., J.R. Neilson, and P.A. Sharp. 2007. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods*. 4:721-726.

Eckford, P.D., C. Li, M. Ramjeesingh, and C.E. Bear. 2012. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner. *J Biol Chem*. 287:36639-36649.

Eckrich, J., U.M. Zissler, F. Serve, P. Leutz, C. Smaczny, S. Schmitt-Grohe, D. Fussbroich, R. Schubert, S. Zielen, and O. Eickmeier. 2017. Airway inflammation in mild cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 16:107-115.

Egan, M.E., J. Glockner-Pagel, C. Ambrose, P.A. Cahill, L. Pappoe, N. Balamuth, E. Cho, S. Canny, C.A. Wagner, J. Geibel, and M.J. Caplan. 2002. Calcium-pump inhibitors induce functional surface expression of Delta F508-CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells. *Nat Med*. 8:485-492.

Egan, M.E., M. Pearson, S.A. Weiner, V. Rajendran, D. Rubin, J. Glockner-Pagel, S. Canny, K. Du, G.L. Lukacs, and M.J. Caplan. 2004. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science*. 304:600-602.

Eichhorn, S.W., H. Guo, S.E. McGeary, R.A. Rodriguez-Mias, C. Shin, D. Baek, S.H. Hsu, K. Ghoshal, J. Villen, and D.P. Bartel. 2014. mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol Cell*. 56:104-115.

Eidelman, O., M. Srivastava, J. Zhang, X. Leighton, J. Murtie, C. Jozwik, K. Jacobson, D.L. Weinstein, E.L. Metcalf, and 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.* 7:523-534.

Eissa, S., M. Matboli, R. Aboushahba, M.M. Bekhet, and Y. Soliman. 2016. Urinary exosomal microRNA panel unravels novel biomarkers for diagnosis of type 2 diabetic kidney disease. *J Diabetes Complications*. 30:1585-1592.

El-Hefnawy, T., S. Raja, L. Kelly, W.L. Bigbee, J.M. Kirkwood, J.D. Luketich, and T.E. Godfrey. 2004. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin Chem*. 50:564-573.

El Hiani, Y., and P. Linsdell. 2010. Changes in accessibility of cytoplasmic substances to the pore associated with activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *J Biol Chem*.

Elborn, J.S., B.W. Ramsey, M.P. Boyle, M.W. Konstan, X. Huang, G. Marigowda, D. Waltz, C.E. Wainwright, T. Vx, and T.s. groups. 2016. Efficacy and safety of lumacaftor/ivacaftor combination therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR by pulmonary function subgroup: a pooled analysis. *The Lancet. Respiratory medicine*.

Elkins, M.R., M. Robinson, B.R. Rose, C. Harbour, C.P. Moriarty, G.B. Marks, E.G. Belousova, W. Xuan, P.T. Bye, and G. National Hypertonic Saline in Cystic Fibrosis Study. 2006. A controlled trial of long-term inhaled hypertonic saline in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 354:229-240.

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

Elzi, D.J., A.J. Bjornsen, T. MacKenzie, T.H. Wyman, and C.C. Silliman. 2001. Ionomycin causes activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol*. 281:C350-360.

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

Encarnacion-Medina, J., C. Ortiz, R. Vergne, L. Padilla, and J. Matta. 2019. MicroRNA Expression Changes in Women with Breast Cancer Stratified by DNA Repair Capacity Levels. *J Oncol*. 2019:7820275.

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

Erdogan, B., C. Facey, J. Qualtieri, J. Tedesco, E. Rinker, R.B. Isett, J. Tobias, D.A. Baldwin, J.E. Thompson, M. Carroll, and A.S. Kim. 2011. Diagnostic microRNAs in myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol*. 39:915-926 e912.

Esther, C.R., Jr., R.D. Coakley, A.G. Henderson, Y.H. Zhou, F.A. Wright, and R.C. Boucher. 2015. Metabolomic Evaluation of Neutrophilic Airway Inflammation in Cystic Fibrosis. *Chest*. 148:507-515.

Esther, C.R., Jr., M.S. Muhlebach, C. Ehre, D.B. Hill, M.C. Wolfgang, M. Kesimer, K.A. Ramsey, M.R. Markovetz, I.C. Garbarine, M.G. Forest, I. Seim, B. Zorn, C.B. Morrison, M.F. Delion, W.R. Thelin, D. Villalon, J.R. Sabater, L. Turkovic, S. Ranganathan, S.M. Stick, and R.C. Boucher. 2019. Mucus accumulation in the lungs precedes structural changes and infection in children with cystic fibrosis. *Science translational medicine*. 11.

Esther, C.R., Jr., L. Turkovic, T. Rosenow, M.S. Muhlebach, R.C. Boucher, S. Ranganathan, S.M. Stick, and C.F. Arest. 2016. Metabolomic biomarkers predictive of early structural lung disease in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 48:1612-1621.

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

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

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

Fabbri, E., A. Tamanini, T. Jakova, J. Gasparello, A. Manicardi, R. Corradini, G. Sabbioni, A. Finotti, M. Borgatti, I. Lampronti, S. Munari, M.C. Dechecchi, G. Cabrini, and R. Gambari. 2017. A Peptide Nucleic Acid against MicroRNA miR-145-5p Enhances the Expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) in Calu-3 Cells. *Molecules*. 23.

Fadok, V.A., D.L. Bratton, L. Guthrie, and P.M. Henson. 2001. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol*. 166:6847-6854.

Farber, S. 1943. Pancreatic insufficiency and the celiac syndrome. *N Engl J Med*. 229:653-682.

Farrel, P., C. Le Marechal, C. Ferec, M. Siker, and M. Teschler-Nicola. 2007. Discovery of the Principal Cystic Fibrosis Mutation (F508del) in Ancient DNA from Iron Age Europeans. *Nature Precedings*.

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

Fata, J.E., Y.Y. Kong, J. Li, T. Sasaki, J. Irie-Sasaki, R.A. Moorehead, R. Elliott, S. Scully, E.B. Voura, D.L. Lacey, W.J. Boyle, R. Khokha, and J.M. Penninger. 2000. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell*. 103:41-50.

Finger, F., and T. Hoppe. 2014. MicroRNAs meet calcium: joint venture in ER proteostasis. *Sci Signal*. 7:re11.

Finotti, A., J. Gasparello, E. Fabbri, A. Tamanini, R. Corradini, M.C. Dechecchi, G. Cabrini, and R. Gambari. 2019. Enhancing the Expression of CFTR Using Antisense Molecules Against MicroRNA miR-145-5p. *Am J Respir Crit Care Med*.

Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature*. 391:806-811.

Fleming, I., B. Fisslthaler, and R. Busse. 1995. Calcium signaling in endothelial cells involves activation of tyrosine kinases and leads to activation of mitogen-activated protein kinases. *Circulation research*. 76:522-529.

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

Flynn, J.M., D. Niccum, J.M. Dunitz, and R.C. Hunter. 2016. Evidence and Role for Bacterial Mucin Degradation in Cystic Fibrosis Airway Disease. *PLoS Pathog*. 12:e1005846.

Frampton, A.E., L. Castellano, T. Colombo, E. Giovannetti, J. Krell, J. Jacob, L. Pellegrino, L. Roca-Alonso, N. Funel, T.M. Gall, A. De Giorgio, F.G. Pinho, V. Fulci, D.J. Britton, R. Ahmad, N.A. Habib, R.C. Coombes, V. Harding, T. Knosel, J. Stebbing, and L.R. Jiao. 2014. MicroRNAs cooperatively inhibit a network of tumor suppressor genes to promote pancreatic tumor growth and progression. *Gastroenterology*. 146:268-277 e218.

Frayman, K.B., D.S. Armstrong, R. Carzino, T.W. Ferkol, K. Grimwood, G.A. Storch, S.M. Teo, K.M. Wylie, and S.C. Ranganathan. 2017. The lower airway microbiota in early cystic fibrosis lung disease: a longitudinal analysis. *Thorax*. 72:1104-1112.

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

Fu, Z., K. Bettega, S. Carroll, K.R. Buchholz, and T.E. Machen. 2007. Role of Ca2+ in responses of airway epithelia to Pseudomonas aeruginosa, flagellin, ATP, and thapsigargin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 292:L353-364.

Fuchs, H.J., D.S. Borowitz, D.H. Christiansen, E.M. Morris, M.L. Nash, B.W. Ramsey, B.J. Rosenstein, A.L. Smith, and M.E. Wohl. 1994. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med*. 331:637-642.

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

Funakoshi, M., Y. Sonoda, K. Tago, S. Tominaga, and T. Kasahara. 2001. Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidyl inositol 3-kinase in the IL-1-mediated NF-kappa B and AP-1 activation. *Int Immunopharmacol*. 1:595-604.

Furio-Tari, P., S. Tarazona, T. Gabaldon, A.J. Enright, and A. Conesa. 2016. spongeScan: A web for detecting microRNA binding elements in lncRNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 44:W176-180.

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

Gadsby, D.C., P. Vergani, and L. Csanady. 2006. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*. 440:477-483.

Garcia-Lacarte, M., J.A. Martinez, M.A. Zulet, and F.I. Milagro. 2018. Implication of miR-612 and miR-1976 in the regulation of TP53 and CD40 and their relationship in the response to specific weight-loss diets. *PLoS One*. 13:e0201217.

Garmilla-Ezquerra, P., C. Sanudo, J. Delgado-Calle, M.I. Perez-Nunez, M. Sumillera, and J.A. Riancho. 2015. Analysis of the bone microRNome in osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int*. 96:30-37.

Garrod, and Hurley. 1912. Congenital familal steatorrhoea. *QJ Med*. 6:242-258.

Geary, R.S., D. Norris, R. Yu, and C.F. Bennett. 2015. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*. 87:46-51.

Gelman, M.S., E.S. Kannegaard, and R.R. Kopito. 2002. A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*. 277:11709-11714.

Gentzsch, M., H. Dang, Y. Dang, A. Garcia-Caballero, H. Suchindran, R.C. Boucher, and M.J. Stutts. 2010. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator impedes proteolytic stimulation of the epithelial Na+ channel. *J Biol Chem*. 285:32227-32232.

Gibson. 2002. Elsevier Science Ltd. *Respiratory Medicine*.

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

Gilar, M., A. Belenky, Y. Budman, D.L. Smisek, and A.S. Cohen. 1998. Study of phosphorothioate-modified oligonucleotide resistance to 3'-exonuclease using capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 714:13-20.

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

Gilot, D., M. Migault, L. Bachelot, F. Journe, A. Rogiers, E. Donnou-Fournet, A. Mogha, N. Mouchet, M.L. Pinel-Marie, B. Mari, T. Montier, S. Corre, A. Gautron, F. Rambow, P. El Hajj, R. Ben Jouira, S. Tartare-Deckert, J.C. Marine, B. Felden, G. Ghanem, and M.D. Galibert. 2017. A non-coding function of TYRP1 mRNA promotes melanoma growth. *Nat Cell Biol*. 19:1348-1357.

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

Glick, D., S. Barth, and K.F. Macleod. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 221:3-12.

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, and 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*. 85:4122-4134.

Goldstein, W., and G. Doring. 1986. Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis*. 134:49-56.

Gong, J., F. Wang, B. Xiao, N. Panjwani, F. Lin, K. Keenan, J. Avolio, M. Esmaeili, L. Zhang, G. He, D. Soave, S. Mastromatteo, Z. Baskurt, S. Kim, W.K. O'Neal, D. Polineni, S.M. Blackman, H. Corvol, G.R. Cutting, M. Drumm, M.R. Knowles, J.M. Rommens, L. Sun, and L.J. Strug. 2019. Genetic association and transcriptome integration identify contributing genes and tissues at cystic fibrosis modifier loci. *PLoS Genet*. 15:e1008007.

Grasedieck, S., A. Sorrentino, C. Langer, C. Buske, H. Dohner, D. Mertens, and F. Kuchenbauer. 2013. Circulating microRNAs in hematological diseases: principles, challenges, and perspectives. *Blood*. 121:4977-4984.

Greene, C.M., T.P. Carroll, S.G. Smith, C.C. Taggart, J. Devaney, S. Griffin, J. O'Neill S, and N.G. McElvaney. 2005. TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Immunol*. 174:1638-1646.

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

Griesenbach, U., M. Inoue, C. Meng, R. Farley, M. Chan, N.K. Newman, A. Brum, J. You, A. Kerton, A. Shoemark, A.C. Boyd, J.C. Davies, T.E. Higgins, D.R. Gill, S.C. Hyde, J.A. Innes, D.J. Porteous, M. Hasegawa, and E.W. Alton. 2012. Assessment of F/HN-pseudotyped lentivirus as a clinically relevant vector for lung gene therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 186:846-856.

Grimson, A., K.K. Farh, W.K. Johnston, P. Garrett-Engele, L.P. Lim, and D.P. Bartel. 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*. 27:91-105.

Guo, H., N.T. Ingolia, J.S. Weissman, and D.P. Bartel. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 466:835-840.

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

Gustafsson, J.K., A. Ermund, D. Ambort, M.E. Johansson, H.E. Nilsson, K. Thorell, H. Hebert, H. Sjovall, and G.C. Hansson. 2012. Bicarbonate and functional CFTR channel are required for proper mucin secretion and link cystic fibrosis with its mucus phenotype. *J Exp Med*. 209:1263-1272.

Gutteridge, C., and R.J. Kuhn. 1994. Pulmozyme--Dornase alfa. *Pediatr Nurs*. 20:278-279.

Habib, A.R., M. Kajbafzadeh, S. Desai, C.L. Yang, K. Skolnik, and B.S. Quon. 2019. A Systematic Review of the Clinical Efficacy and Safety of CFTR Modulators in Cystic Fibrosis. *Sci Rep*. 9:7234.

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

Hallows, K.R., A.C. Fitch, C.A. Richardson, P.R. Reynolds, J.P. Clancy, P.C. Dagher, L.A. Witters, J.K. Kolls, and J.M. Pilewski. 2006. Up-regulation of AMP-activated kinase by dysfunctional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in cystic fibrosis airway epithelial cells mitigates excessive inflammation. *J Biol Chem*. 281:4231-4241.

Hallstrand, T.S., T.L. Hackett, W.A. Altemeier, G. Matute-Bello, P.M. Hansbro, and D.A. Knight. 2014. Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation. *Clin Immunol*. 151:1-15.

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

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

Harada, M., X. Luo, T. Murohara, B. Yang, D. Dobrev, and S. Nattel. 2014. MicroRNA regulation and cardiac calcium signaling: role in cardiac disease and therapeutic potential. *Circulation research*. 114:689-705.

Hartl, D., P. Latzin, P. Hordijk, V. Marcos, C. Rudolph, M. Woischnik, S. Krauss-Etschmann, B. Koller, D. Reinhardt, A.A. Roscher, D. Roos, and M. Griese. 2007. Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nat Med*. 13:1423-1430.

Hartl, D., N. Lehmann, F. Hoffmann, A. Jansson, A. Hector, G. Notheis, D. Roos, B.H. Belohradsky, and U. Wintergerst. 2008. Dysregulation of innate immune receptors on neutrophils in chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol*. 121:375-382 e379.

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

Havasi, V., C.O. Hurst, T.C. Briles, F. Yang, D.G. Bains, D.J. Hassett, and E. Sorscher. 2008. Inhibitory effects of hypertonic saline on P. aeruginosa motility. *J Cyst Fibros*. 7:267-269.

Hawkins, F.J., and D.N. Kotton. 2018. Pulmonary Ionocytes Challenge the Paradigm in Cystic Fibrosis. *Trends Pharmacol Sci*. 39:852-854.

Hayden, M.S., and S. Ghosh. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 18:2195-2224.

He, T., R. Sun, Y. Li, and Z.S. Katusic. 2018. Effects of Brain-Derived Neurotrophic Factor on MicroRNA Expression Profile in Human Endothelial Progenitor Cells. *Cell Transplant*. 27:1005-1009.

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

Henke, M.O., and F. Ratjen. 2007. Mucolytics in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 8:24-29.

Henke, M.O., A. Renner, B.K. Rubin, J.I. Gyves, E. Lorenz, and J.S. Koo. 2006. Up-regulation of S100A8 and S100A9 protein in bronchial epithelial cells by lipopolysaccharide. *Exp Lung Res*. 32:331-347.

Holkers, M., I. Maggio, J. Liu, J.M. Janssen, F. Miselli, C. Mussolino, A. Recchia, T. Cathomen, and M.A. Goncalves. 2013. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Res*. 41:e63.

Hrdlickova, R., J. Nehyba, W. Bargmann, and H.R. Bose, Jr. 2014. Multiple tumor suppressor microRNAs regulate telomerase and TCF7, an important transcriptional regulator of the Wnt pathway. *PLoS One*. 9:e86990.

Hu, J., M. Kong, Y. Ye, S. Hong, L. Cheng, and L. Jiang. 2014. Serum miR-206 and other muscle-specific microRNAs as non-invasive biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *J Neurochem*. 129:877-883.

Huang, E., L. Showalter, S. Xu, B.J. Czernliecki, and G.K. Koski. 2017. Calcium mobilizing treatment acts as a co-signal for TLR-mediated induction of Interleukin-12 (IL-12p70) secretion by murine bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol*. 314:26-35.

Huang, S., T. Dudez, I. Scerri, M.A. Thomas, B.N. Giepmans, S. Suter, and M. Chanson. 2003. Defective activation of c-Src in cystic fibrosis airway epithelial cells results in loss of tumor necrosis factor-alpha-induced gap junction regulation. *J Biol Chem*. 278:8326-8332.

Huang, Y., S. Zhang, X. Fang, L. Qin, Y. Fan, D. Ding, X. Liu, and M. Xie. 2018. Plasma miR-199a-5p is increased in neutrophilic phenotype asthma patients and negatively correlated with pulmonary function. *PLoS One*. 13:e0193502.

Hunter, M.J., K.J. Treharne, A.K. Winter, D.M. Cassidy, S. Land, and A. Mehta. 2010. Expression of wild-type CFTR suppresses NF-kappaB-driven inflammatory signalling. *PLoS One*. 5:e11598.

Hunter, M.P., N. Ismail, X. Zhang, B.D. Aguda, E.J. Lee, L. Yu, T. Xiao, J. Schafer, M.L. Lee, T.D. Schmittgen, S.P. Nana-Sinkam, D. Jarjoura, and C.B. Marsh. 2008. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*. 3:e3694.

Hutvagner, G., and P.D. Zamore. 2002a. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 297:2056-2060.

Hutvagner, G., and P.D. Zamore. 2002b. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev*. 12:225-232.

Hybiske, K., J.K. Ichikawa, V. Huang, S.J. Lory, and T.E. Machen. 2004. Cystic fibrosis airway epithelial cell polarity and bacterial flagellin determine host response to Pseudomonas aeruginosa. *Cell Microbiol*. 6:49-63.

Hyde, S.C., I.A. Pringle, S. Abdullah, A.E. Lawton, L.A. Davies, A. Varathalingam, G. Nunez-Alonso, A.M. Green, R.P. Bazzani, S.G. Sumner-Jones, M. Chan, H. Li, N.S. Yew, S.H. Cheng, A.C. Boyd, J.C. Davies, U. Griesenbach, D.J. Porteous, D.N. Sheppard, F.M. Munkonge, E.W. Alton, and D.R. Gill. 2008. CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat Biotechnol*. 26:549-551.

Ichikawa, J., and T. Kiyohara. 2001. Suppression of EGF-induced cell proliferation by the blockade of Ca2+ mobilization and capacitative Ca2+ entry in mouse mammary epithelial cells. *Cell Biochem Funct*. 19:213-219.

Ideozu, J.E., X. Zhang, S. McColley, and H. Levy. 2019. Transcriptome Profiling and Molecular Therapeutic Advances in Cystic Fibrosis: Recent Insights. *Genes (Basel)*. 10.

Igreja, S., L.A. Clarke, H.M. Botelho, L. Marques, and M.D. Amaral. 2016. Correction of a Cystic Fibrosis Splicing Mutation by Antisense Oligonucleotides. *Hum Mutat*. 37:209-215.

Iori, V., A.M. Iyer, T. Ravizza, L. Beltrame, L. Paracchini, S. Marchini, M. Cerovic, C. Hill, M. Ferrari, M. Zucchetti, M. Molteni, C. Rossetti, R. Brambilla, H. Steve White, M. D'Incalci, E. Aronica, and A. Vezzani. 2017. Blockade of the IL-1R1/TLR4 pathway mediates disease-modification therapeutic effects in a model of acquired epilepsy. *Neurobiol Dis*. 99:12-23.

Itani, O.A., J.H. Chen, P.H. Karp, S. Ernst, S. Keshavjee, K. Parekh, J. Klesney-Tait, J. Zabner, and M.J. Welsh. 2011. Human cystic fibrosis airway epithelia have reduced Cl- conductance but not increased Na+ conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:10260-10265.

Jacob, T., R.J. Lee, J.N. Engel, and T.E. Machen. 2002. Modulation of cytosolic Ca(2+) concentration in airway epithelial cells by Pseudomonas aeruginosa. *Infect Immun*. 70:6399-6408.

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

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

Jahnsen, F.L., D.H. Strickland, J.A. Thomas, I.T. Tobagus, S. Napoli, G.R. Zosky, D.J. Turner, P.D. Sly, P.A. Stumbles, and P.G. Holt. 2006. Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *J Immunol*. 177:5861-5867.

Jang, J.Y., Y.S. Lee, Y.K. Jeon, K. Lee, J.J. Jang, and C.W. Kim. 2013. ANT2 suppression by shRNA restores miR-636 expression, thereby downregulating Ras and inhibiting tumorigenesis of hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Med*. 45:e3.

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

Jefferson, K.K., M.F. Smith, Jr., and D.A. Bobak. 1999. Roles of intracellular calcium and NF-kappa B in the Clostridium difficile toxin A-induced up-regulation and secretion of IL-8 from human monocytes. *J Immunol*. 163:5183-5191.

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

Jia, L., Y.F. Li, G.F. Wu, Z.Y. Song, H.Z. Lu, C.C. Song, Q.L. Zhang, J.Y. Zhu, G.S. Yang, and X.E. Shi. 2013. MiRNA-199a-3p regulates C2C12 myoblast differentiation through IGF-1/AKT/mTOR signal pathway. *Int J Mol Sci*. 15:296-308.

Jopling, C.L., M. Yi, A.M. Lancaster, S.M. Lemon, and P. Sarnow. 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 309:1577-1581.

Joseph, T., D. Look, and T. Ferkol. 2005. NF-kappaB activation and sustained IL-8 gene expression in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelial cells stimulated with Pseudomonas aeruginosa. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 288:L471-479.

Jun, I., M.H. Cheng, E. Sim, J. Jung, B.L. Suh, Y. Kim, H. Son, K. Park, C.H. Kim, J.H. Yoon, D.C. Whitcomb, I. Bahar, and M.G. Lee. 2016. Pore dilatation increases the bicarbonate permeability of CFTR, ANO1 and glycine receptor anion channels. *J Physiol*. 594:2929-2955.

Kammouni, W., C. Figarella, S. Marchand, and M. Merten. 1997. Altered cytokine production by cystic fibrosis tracheal gland serous cells. *Infect Immun*. 65:5176-5183.

Kang, J.H., S.M. Hwang, and I.Y. Chung. 2015. S100A8, S100A9 and S100A12 activate airway epithelial cells to produce MUC5AC via extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor-kappaB pathways. *Immunology*. 144:79-90.

Kantari, C., M. Pederzoli-Ribeil, and V. Witko-Sarsat. 2008. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib Microbiol*. 15:118-146.

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

Kariko, K., H. Muramatsu, J. Ludwig, and D. Weissman. 2011. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res*. 39:e142.

Kariko, K., H. Muramatsu, F.A. Welsh, J. Ludwig, H. Kato, S. Akira, and D. Weissman. 2008. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*. 16:1833-1840.

Karreth, F.A., Y. Tay, D. Perna, U. Ala, S.M. Tan, A.G. Rust, G. DeNicola, K.A. Webster, D. Weiss, P.A. Perez-Mancera, M. Krauthammer, R. Halaban, P. Provero, D.J. Adams, D.A. Tuveson, and P.P. Pandolfi. 2011. In vivo identification of tumor- suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell*. 147:382-395.

Kawai, T., and S. Akira. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 11:373-384.

Keeler, D.M., M.K. Grandal, and J.R. McCall. 2019. Brevenal, a Marine Natural Product, is Anti-Inflammatory and an Immunomodulator of Macrophage and Lung Epithelial Cells. *Mar Drugs*. 17.

Kelher, M.R., D.R. Ambruso, D.J. Elzi, S.M. Anderson, A.J. Paterson, G.W. Thurman, and C.C. Silliman. 2003. Formyl-Met-Leu-Phe induces calcium-dependent tyrosine phosphorylation of Rel-1 in neutrophils. *Cell Calcium*. 34:445-455.

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

Kenagy, R.D., M. Civelek, S. Kikuchi, L. Chen, A. Grieff, M. Sobel, A.J. Lusis, and A.W. Clowes. 2016. Scavenger receptor class A member 5 (SCARA5) and suprabasin (SBSN) are hub genes of coexpression network modules associated with peripheral vein graft patency. *J Vasc Surg*. 64:202-209 e206.

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

Kerem, B., O. Chiba-Falek, and E. Kerem. 1997. Cystic fibrosis in Jews: frequency and mutation distribution. *Genet Test*. 1:35-39.

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

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

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

Khan, M.A., Z.S. Ali, N. Sweezey, H. Grasemann, and N. Palaniyar. 2019. Progression of Cystic Fibrosis Lung Disease from Childhood to Adulthood: Neutrophils, Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation, and NET Degradation. *Genes (Basel)*. 10.

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

Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena. 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 115:209-216.

Kim, K., R.J. Hung, and N. Perrimon. 2017. miR-263a Regulates ENaC to Maintain Osmotic and Intestinal Stem Cell Homeostasis in Drosophila. *Dev Cell*. 40:23-36.

Kim, S.J., and W.R. Skach. 2012. Mechanisms of CFTR Folding at the Endoplasmic Reticulum. *Frontiers in pharmacology*. 3:201.

Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:126-139.

Kim, Y.M., W. Reed, W. Wu, P.A. Bromberg, L.M. Graves, and J.M. Samet. 2006. Zn2+-induced IL-8 expression involves AP-1, JNK, and ERK activities in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 290:L1028-1035.

Kitamura, M. 2011. Control of NF-kappaB and inflammation by the unfolded protein response. *Int Rev Immunol*. 30:4-15.

Kleinstiver, B.P., V. Pattanayak, M.S. Prew, S.Q. Tsai, N.T. Nguyen, Z. Zheng, and J.K. Joung. 2016. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. 529:490-495.

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

Knoop, K.A., N. Kumar, B.R. Butler, S.K. Sakthivel, R.T. Taylor, T. Nochi, H. Akiba, H. Yagita, H. Kiyono, and I.R. Williams. 2009. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol*. 183:5738-5747.

Knorre, A., M. Wagner, H.E. Schaefer, W.H. Colledge, and H.L. Pahl. 2002. DeltaF508-CFTR causes constitutive NF-kappaB activation through an ER- overload response in cystic fibrosis lungs. 383:271-282.

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

Knutsen, A.P., and K.R. Mueller. 1990. T cell cytotoxicity in cystic fibrosis: relationship to pulmonary status. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 93:54-58.

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

Koller, D.Y., I. Nething, J. Otto, R. Urbanek, and I. Eichler. 1997. Cytokine concentrations in sputum from patients with cystic fibrosis and their relation to eosinophil activity. *Am J Respir Crit Care Med*. 155:1050-1054.

Kong, Y.Y., H. Yoshida, I. Sarosi, H.L. Tan, E. Timms, C. Capparelli, S. Morony, A.J. Oliveira-dos-Santos, G. Van, A. Itie, W. Khoo, A. Wakeham, C.R. Dunstan, D.L. Lacey, T.W. Mak, W.J. Boyle, and J.M. Penninger. 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 397:315-323.

Konstan, M.W., and M. Berger. 1997. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol*. 24:137-142; discussion 159-161.

Konstan, M.W., K.A. Hilliard, T.M. Norvell, and M. Berger. 1994. Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation [published erratum appears in Am J Respir Crit Care Med 1995 Jan;151(1):260]. *Am J Respir Crit Care Med*. 150:448-454.

Kota, S.K., and S. Balasubramanian. 2010. Cancer therapy via modulation of micro RNA levels: a promising future. *Drug Discov Today*. 15:733-740.

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

Kouri, F.M., L.A. Hurley, W.L. Daniel, E.S. Day, Y. Hua, L. Hao, C.Y. Peng, T.J. Merkel, M.A. Queisser, C. Ritner, H. Zhang, C.D. James, J.I. Sznajder, L. Chin, D.A. Giljohann, J.A. Kessler, M.E. Peter, C.A. Mirkin, and A.H. Stegh. 2015. miR-182 integrates apoptosis, growth, and differentiation programs in glioblastoma. *Genes Dev*. 29:732-745.

Kozlova, I., H. Nilsson, M. Phillipson, B. Riederer, U. Seidler, W.H. Colledge, and G.M. Roomans. 2005. X-ray microanalysis of airway surface liquid in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 288:L874-878.

Kozlova, I., V. Vanthanouvong, M. Johannesson, and G.M. Roomans. 2006. Composition of airway surface liquid determined by X-ray microanalysis. *Ups J Med Sci*. 111:137-153.

Kozomara, A., and S. Griffiths-Jones. 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 42:D68-73.

Krause, K., B.T. Kopp, M.F. Tazi, K. Caution, K. Hamilton, A. Badr, C. Shrestha, D. Tumin, D. Hayes, Jr., F. Robledo-Avila, L. Hall-Stoodley, B.G. Klamer, X. Zhang, S. Partida-Sanchez, N.L. Parinandi, S.E. Kirkby, D. Dakhlallah, K.S. McCoy, E. Cormet-Boyaka, and A.O. Amer. 2018. The expression of Mirc1/Mir17-92 cluster in sputum samples correlates with pulmonary exacerbations in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 17:454-461.

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

Krek, A., D. Grun, M.N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E.J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K.C. Gunsalus, M. Stoffel, and N. Rajewsky. 2005. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*. 37:495-500.

Krützfeldt, J., N. Rajewsky, R. Braich, K.G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, and M. Stoffel. 2005. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 438:685-689.

Kube, D., U. Sontich, D. Fletcher, and P.B. Davis. 2001. Proinflammatory cytokine responses to P. aeruginosa infection in human airway epithelial cell lines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 280:L493-502.

Kumar, M.S., E. Armenteros-Monterroso, P. East, P. Chakravorty, N. Matthews, M.M. Winslow, and J. Downward. 2014. HMGA2 functions as a competing endogenous RNA to promote lung cancer progression. *Nature*. 505:212-217.

Kumar, P., S. Bhattacharyya, K.W. Peters, M.L. Glover, A. Sen, R.T. Cox, S. Kundu, H. Caohuy, R.A. Frizzell, H.B. Pollard, and R. Biswas. 2015. miR-16 rescues F508del-CFTR function in native cystic fibrosis epithelial cells. *Gene Ther*. 22:908-916.

Kunzelmann, K., S. Kathofer, and R. Greger. 1995. Na+ and Cl- conductances in airway epithelial cells: increased Na+ conductance in cystic fibrosis. *Pflugers Arch*. 431:1-9.

Kunzelmann, K., M. Mall, M. Briel, A. Hipper, R. Nitschke, S. Ricken, and R. Greger. 1997. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator attenuates the endogenous Ca2+ activated Cl- conductance of Xenopus oocytes. *Pflugers Arch*. 435:178-181.

Lai, E., T. Teodoro, and A. Volchuk. 2007. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)*. 22:193-201.

Landsteiner, K. 1905. Darmverschluss durch eingedicktes meconium. Pankreatitis. *Zentrabl Allg Pathol*. 16:903-907.

Landthaler, M., A. Yalcin, and T. Tuschl. 2004. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol*. 14:2162-2167.

Law, S.M., and R.D. Gray. 2017. Neutrophil extracellular traps and the dysfunctional innate immune response of cystic fibrosis lung disease: a review. *J Inflamm (Lond)*. 14:29.

Lawrence, T., and D.W. Gilroy. 2007. Chronic inflammation: a failure of resolution? *Int J Exp Pathol*. 88:85-94.

Ledder, O., W. Haller, R.T. Couper, P. Lewindon, and M. Oliver. 2014. Cystic fibrosis: an update for clinicians. Part 2: hepatobiliary and pancreatic manifestations. *J Gastroenterol Hepatol*. 29:1954-1962.

Lee, C.M., R. Flynn, J.A. Hollywood, M.F. Scallan, and P.T. Harrison. 2012. Correction of the DeltaF508 Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene by Zinc-Finger Nuclease Homology-Directed Repair. *Biores Open Access*. 1:99-108.

Lee, G., T.C. Walser, and S.M. Dubinett. 2009. Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer. *Curr Opin Pulm Med*. 15:303-307.

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

Lee, W.L., R.E. Harrison, and S. Grinstein. 2003a. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect*. 5:1299-1306.

Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, and V.N. Kim. 2003b. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 425:415-419.

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

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

Levin, A.A. 2019. Treating Disease at the RNA Level with Oligonucleotides. *N Engl J Med*. 380:57-70.

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

Li, J., X.D. Johnson, S. Iazvovskaia, A. Tan, A. Lin, and M.B. Hershenson. 2003. Signaling intermediates required for NF-kappa B activation and IL-8 expression in CF bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 284:L307-315.

Li, J., and Z. Zhang. 2013. miRNA regulatory variation in human evolution. *Trends Genet*. 29:116-124.

Li, J., Z. Zhang, L. Xiong, C. Guo, T. Jiang, L. Zeng, G. Li, and J. Wang. 2017. SNHG1 lncRNA negatively regulates miR-199a-3p to enhance CDK7 expression and promote cell proliferation in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 487:146-152.

Li, J.D., W. Feng, M. Gallup, J.H. Kim, J. Gum, Y. Kim, and C. Basbaum. 1998. Activation of NF-kappaB via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for Pseudomonas aeruginosa-induced mucin overproduction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:5718-5723.

Lilienbaum, A., and A. Israel. 2003. From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons. *Mol Cell Biol*. 23:2680-2698.

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

Ling, H., M. Fabbri, and G.A. Calin. 2013. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 12:847-865.

Lino Cardenas, C.L., I.S. Henaoui, E. Courcot, C. Roderburg, C. Cauffiez, S. Aubert, M.C. Copin, B. Wallaert, F. Glowacki, E. Dewaeles, J. Milosevic, J. Maurizio, J. Tedrow, B. Marcet, J.M. Lo-Guidice, N. Kaminski, P. Barbry, T. Luedde, M. Perrais, B. Mari, and N. Pottier. 2013. miR-199a-5p Is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation by targeting caveolin-1. *PLoS Genet*. 9:e1003291.

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

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

Liu, Y., T. Li, Y. Xu, E. Xu, M. Zhou, B. Wang, and J. Shen. 2016. Effects of TLR4 gene silencing on the proliferation and apotosis of hepatocarcinoma HEPG2 cells. *Oncol Lett*. 11:3054-3060.

Livraghi-Butrico, A., B.R. Grubb, K.J. Wilkinson, A.S. Volmer, K.A. Burns, C.M. Evans, W.K. O'Neal, and R.C. Boucher. 2017. Contribution of mucus concentration and secreted mucins Muc5ac and Muc5b to the pathogenesis of muco-obstructive lung disease. *Mucosal Immunol*. 10:395-407.

Llano-Diez, M., C.I. Ortez, J.A. Gay, L. Alvarez-Cabado, C. Jou, J. Medina, A. Nascimento, and C. Jimenez-Mallebrera. 2017. Digital PCR quantification of miR-30c and miR-181a as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 27:15-23.

Loitsch, S.M., C. von Mallinckrodt, S. Kippenberger, D. Steinhilber, T.O. Wagner, and J. Bargon. 2000. Reactive oxygen intermediates are involved in IL-8 production induced by hyperosmotic stress in human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 276:571-578.

Lombardo, A., P. Genovese, C.M. Beausejour, S. Colleoni, Y.L. Lee, K.A. Kim, D. Ando, F.D. Urnov, C. Galli, P.D. Gregory, M.C. Holmes, and L. Naldini. 2007. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol*. 25:1298-1306.

Londin, E., P. Loher, A.G. Telonis, K. Quann, P. Clark, Y. Jing, E. Hatzimichael, Y. Kirino, S. Honda, M. Lally, B. Ramratnam, C.E. Comstock, K.E. Knudsen, L. Gomella, G.L. Spaeth, L. Hark, L.J. Katz, A. Witkiewicz, A. Rostami, S.A. Jimenez, M.A. Hollingsworth, J.J. Yeh, C.A. Shaw, S.E. McKenzie, P. Bray, P.T. Nelson, S. Zupo, K. Van Roosbroeck, M.J. Keating, G.A. Calin, C. Yeo, M. Jimbo, J. Cozzitorto, J.R. Brody, K. Delgrosso, J.S. Mattick, P. Fortina, and I. Rigoutsos. 2015. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112:E1106-1115.

Lopes-Pacheco, M. 2016. CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Frontiers in pharmacology*. 7:275.

Loureiro, C.A., A.M. Matos, A. Dias-Alves, J.F. Pereira, I. Uliyakina, P. Barros, M.D. Amaral, and P. Matos. 2015. A molecular switch in the scaffold NHERF1 enables misfolded CFTR to evade the peripheral quality control checkpoint. *Sci Signal*. 8:ra48.

Lu, W., A. Hisatsune, T. Koga, K. Kato, I. Kuwahara, E.P. Lillehoj, W. Chen, A.S. Cross, S.J. Gendler, A.T. Gewirtz, and K.C. Kim. 2006. Cutting edge: enhanced pulmonary clearance of Pseudomonas aeruginosa by Muc1 knockout mice. *J Immunol*. 176:3890-3894.

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

Ma, X., L.E. Becker Buscaglia, J.R. Barker, and Y. Li. 2011. MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J Mol Cell Biol*. 3:159-166.

Macrae, I.J., K. Zhou, F. Li, A. Repic, A.N. Brooks, W.Z. Cande, P.D. Adams, and J.A. Doudna. 2006. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*. 311:195-198.

Madan, J.C., D.C. Koestler, B.A. Stanton, L. Davidson, L.A. Moulton, M.L. Housman, J.H. Moore, M.F. Guill, H.G. Morrison, M.L. Sogin, T.H. Hampton, M.R. Karagas, P.E. Palumbo, J.A. Foster, P.L. Hibberd, and G.A. O'Toole. 2012. Serial analysis of the gut and respiratory microbiome in cystic fibrosis in infancy: interaction between intestinal and respiratory tracts and impact of nutritional exposures. *MBio*. 3.

Magenta, A., E. Dellambra, R. Ciarapica, and M.C. Capogrossi. 2016. Oxidative stress, microRNAs and cytosolic calcium homeostasis. *Cell Calcium*. 60:207-217.

Mahiny, A.J., A. Dewerth, L.E. Mays, M. Alkhaled, B. Mothes, E. Malaeksefat, B. Loretz, J. Rottenberger, D.M. Brosch, P. Reautschnig, P. Surapolchai, F. Zeyer, A. Schams, M. Carevic, M. Bakele, M. Griese, M. Schwab, B. Nurnberg, S. Beer-Hammer, R. Handgretinger, D. Hartl, C.M. Lehr, and M.S. Kormann. 2015. In vivo genome editing using nuclease-encoding mRNA corrects SP-B deficiency. *Nat Biotechnol*. 33:584-586.

Mall, M., M. Bleich, R. Greger, R. Schreiber, and 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*. 102:15-21.

Mall, M., T. Gonska, J. Thomas, R. Schreiber, H.H. Seydewitz, J. Kuehr, M. Brandis, and K. Kunzelmann. 2003. Modulation of Ca2+-activated Cl- secretion by basolateral K+ channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Pediatr Res*. 53:608-618.

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

Mall, M.A., M. Stahl, S.Y. Graeber, O. Sommerburg, H.U. Kauczor, and M.O. Wielputz. 2016. Early detection and sensitive monitoring of CF lung disease: Prospects of improved and safer imaging. *Pediatr Pulmonol*. 51:S49-S60.

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

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

Margaroli, C., L.W. Garratt, H. Horati, A.S. Dittrich, T. Rosenow, S.T. Montgomery, D.L. Frey, M.R. Brown, C. Schultz, and L. Guglani. 2018. Elastase exocytosis by airway neutrophils associates with early lung damage in Cystic Fibrosis children. *Am J Respir Crit Care Med*.

Marmiroli, S., A. Bavelloni, I. Faenza, A. Sirri, A. Ognibene, V. Cenni, J. Tsukada, Y. Koyama, M. Ruzzene, A. Ferri, P.E. Auron, A. Toker, and N.M. Maraldi. 1998. Phosphatidylinositol 3-kinase is recruited to a specific site in the activated IL-1 receptor I. *FEBS Lett*. 438:49-54.

Marozkina, N.V., S. Yemen, M. Borowitz, L. Liu, M. Plapp, F. Sun, R. Islam, P. Erdmann-Gilmore, R.R. Townsend, C.F. Lichti, S. Mantri, P.W. Clapp, S.H. Randell, B. Gaston, and K. Zaman. 2010. Hsp 70/Hsp 90 organizing protein as a nitrosylation target in cystic fibrosis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:11393-11398.

Mathivanan, S., C.J. Fahner, G.E. Reid, and R.J. Simpson. 2012. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res*. 40:D1241-1244.

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

Matsui, H., M.W. Verghese, M. Kesimer, U.E. Schwab, S.H. Randell, J.K. Sheehan, B.R. Grubb, and R.C. Boucher. 2005. Reduced three-dimensional motility in dehydrated airway mucus prevents neutrophil capture and killing bacteria on airway epithelial surfaces. *J Immunol*. 175:1090-1099.

Matthes, E., J. Goepp, G.W. Carlile, Y. Luo, K. Dejgaard, A. Billet, R. Robert, D.Y. Thomas, and J.W. Hanrahan. 2016. Low free drug concentration prevents inhibition of F508del CFTR functional expression by the potentiator VX-770 (ivacaftor). *Br J Pharmacol*. 173:459-470.

Mays, L.E., S. Ammon-Treiber, B. Mothes, M. Alkhaled, J. Rottenberger, E.S. Muller-Hermelink, M. Grimm, M. Mezger, S. Beer-Hammer, E. von Stebut, N. Rieber, B. Nurnberg, M. Schwab, R. Handgretinger, M. Idzko, D. Hartl, and M.S. Kormann. 2013. Modified Foxp3 mRNA protects against asthma through an IL-10-dependent mechanism. *J Clin Invest*. 123:1216-1228.

McKiernan, P., O. Cunningham, C. Greene, and S. Cryan. 2013. Targeting miRNA-based medicines to cystic fibrosis airway epithelial cells using nanotechnology. *International Journal of Nanomedecine*. 8:3907-3915.

McKiernan, P.J., K.P. Molloy, S.A. Cryan, N.G. McElvaney, and C.M. Greene. 2018. X Chromosome-encoded MicroRNAs Are Functionally Increased in Cystic Fibrosis Monocytes. *Am J Respir Crit Care Med*. 197:668-670.

McNally, P., E. Ervine, M.D. Shields, B.D. Dimitrov, B. El Nazir, C.C. Taggart, C.M. Greene, N.G. McElvaney, and P. Greally. 2011. High concentrations of pepsin in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis are associated with high interleukin-8 concentrations. *Thorax*. 66:140-143.

McNamara, N., M. Gallup, A. Sucher, I. Maltseva, D. McKemy, and C. Basbaum. 2006. AsialoGM1 and TLR5 cooperate in flagellin-induced nucleotide signaling to activate Erk1/2. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 34:653-660.

McNeil, P.L., M.P. McKenna, and D.L. Taylor. 1985. A transient rise in cytosolic calcium follows stimulation of quiescent cells with growth factors and is inhibitable with phorbol myristate acetate. *J Cell Biol*. 101:372-379.

Meduri, G.U., S. Kanangat, J. Stefan, E. Tolley, and D. Schaberg. 1999. Cytokines IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha enhance in vitro growth of bacteria. *Am J Respir Crit Care Med*. 160:961-967.

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

Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, and T. Tuschl. 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*. 15:185-197.

Mello, C.C., and D. Conte, Jr. 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature*. 431:338-342.

Mendoza, J.L., A. Schmidt, Q. Li, E. Nuvaga, T. Barrett, R.J. Bridges, A.P. Feranchak, C.A. Brautigam, and P.J. Thomas. 2012. Requirements for efficient correction of DeltaF508 CFTR revealed by analyses of evolved sequences. *Cell*. 148:164-174.

Milla, C.E. 2004. Association of nutritional status and pulmonary function in children with cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 10:505-509.

Minna, E., P. Romeo, L. De Cecco, M. Dugo, G. Cassinelli, S. Pilotti, D. Degl'Innocenti, C. Lanzi, P. Casalini, M.A. Pierotti, A. Greco, and M.G. Borrello. 2014. miR-199a-3p displays tumor suppressor functions in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget*. 5:2513-2528.

Mirkovic, B., M.A. Murray, G.M. Lavelle, K. Molloy, A.A. Azim, C. Gunaratnam, F. Healy, D. Slattery, P. McNally, J. Hatch, M. Wolfgang, M.M. Tunney, M.S. Muhlebach, R. Devery, C.M. Greene, and N.G. McElvaney. 2015. The Role of Short-Chain Fatty Acids, Produced by Anaerobic Bacteria, in the Cystic Fibrosis Airway. *Am J Respir Crit Care Med*. 192:1314-1324.

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

Mitomo, K., U. Griesenbach, M. Inoue, L. Somerton, C. Meng, E. Akiba, T. Tabata, Y. Ueda, G.M. Frankel, R. Farley, C. Singh, M. Chan, F. Munkonge, A. Brum, S. Xenariou, S. Escudero-Garcia, M. Hasegawa, and E.W. Alton. 2010. Toward gene therapy for cystic fibrosis using a lentivirus pseudotyped with Sendai virus envelopes. *Mol Ther*. 18:1173-1182.

Miyamoto, S.D., A. Karimpour-Fard, V. Peterson, S.R. Auerbach, K.R. Stenmark, B.L. Stauffer, and C.C. Sucharov. 2015. Circulating microRNA as a biomarker for recovery in pediatric dilated cardiomyopathy. *J Heart Lung Transplant*. 34:724-733.

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

Mohd Slim, M.A., D. Dick, K. Trimble, and G. McKee. 2016. Paediatric nasal polyps in cystic fibrosis. *BMJ Case Rep*. 2016.

Montgomery, S.T., A.S. Dittrich, L.W. Garratt, L. Turkovic, D.L. Frey, S.M. Stick, M.A. Mall, A. Kicic, and C.F. Arest. 2018. Interleukin-1 is associated with inflammation and structural lung disease in young children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 17:715-722.

Montoro, D.T., A.L. Haber, M. Biton, V. Vinarsky, B. Lin, S.E. Birket, F. Yuan, S. Chen, H.M. Leung, J. Villoria, N. Rogel, G. Burgin, A.M. Tsankov, A. Waghray, M. Slyper, J. Waldman, L. Nguyen, D. Dionne, O. Rozenblatt-Rosen, P.R. Tata, H. Mou, M. Shivaraju, H. Bihler, M. Mense, G.J. Tearney, S.M. Rowe, J.F. Engelhardt, A. Regev, and J. Rajagopal. 2018. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature*. 560:319-324.

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

Moran. 1988. Philadelphia. *Visual Histology*.

Morishita, A., H. Yoneyama, H. Iwama, K. Fujita, M. Watanabe, K. Hirose, T. Tadokoro, K. Oura, T. Sakamoto, S. Mimura, T. Nomura, M. Oryu, T. Himoto, K. Shimotohno, and T. Masaki. 2018. Circulating microRNA-636 is associated with the elimination of hepatitis C virus by ombitasvir/paritaprevir/ritonavir. *Oncotarget*. 9:32054-32062.

Morris, M.R., I.J. Doull, S. Dewitt, and M.B. Hallett. 2005. Reduced iC3b-mediated phagocytotic capacity of pulmonary neutrophils in cystic fibrosis. *Clin Exp Immunol*. 142:68-75.

Moss, R.B., R.C. Bocian, Y.P. Hsu, Y.J. Dong, M. Kemna, T. Wei, and P. Gardner. 1996. Reduced IL-10 secretion by CD4+ T lymphocytes expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Clin Exp Immunol*. 106:374-388.

Moss, R.B., Y.P. Hsu, and L. Olds. 2000. Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes. *Clin Exp Immunol*. 120:518-525.

Mott, L.S., J. Park, C.P. Murray, C.L. Gangell, N.H. de Klerk, P.J. Robinson, C.F. Robertson, S.C. Ranganathan, P.D. Sly, S.M. Stick, and C.F. Arest. 2012. Progression of early structural lung disease in young children with cystic fibrosis assessed using CT. *Thorax*. 67:509-516.

Muhlebach, M.S., and T.L. Noah. 2002. Endotoxin activity and inflammatory markers in the airways of young patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 165:911-915.

Muhlebach, M.S., W. Reed, and T.L. Noah. 2004. Quantitative cytokine gene expression in CF airway. *Pediatr Pulmonol*. 37:393-399.

Muhlebach, M.S., P.W. Stewart, M.W. Leigh, and T.L. Noah. 1999. Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 160:186-191.

Muhlebach, M.S., B.T. Zorn, C.R. Esther, J.E. Hatch, C.P. Murray, L. Turkovic, S.C. Ranganathan, R.C. Boucher, S.M. Stick, and M.C. Wolfgang. 2018. Initial acquisition and succession of the cystic fibrosis lung microbiome is associated with disease progression in infants and preschool children. *PLoS Pathog*. 14:e1006798.

Muir, A., G. Soong, S. Sokol, B. Reddy, M.I. Gomez, A. Van Heeckeren, and A. Prince. 2004. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 30:777-783.

Mul, F.P., A.E. Zuurbier, H. Janssen, J. Calafat, S. van Wetering, P.S. Hiemstra, D. Roos, and P.L. Hordijk. 2000. Sequential migration of neutrophils across monolayers of endothelial and epithelial cells. *J Leukoc Biol*. 68:529-537.

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

Muselet-Charlier, C., T. Roque, E. Boncoeur, K. Chadelat, A. Clement, J. Jacquot, and O. Tabary. 2007a. Enhanced IL-1 beta-induced IL-8 production in cystic fibrosis lung epithelial cells is dependent of both innitogen-activated protein kinases and NF-kappa B signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 357:402-407.

Muselet-Charlier, C., T. Roque, E. Boncoeur, K. Chadelat, A. Clement, J. Jacquot, and O. Tabary. 2007b. Enhanced IL-1beta-induced IL-8 production in cystic fibrosis lung epithelial cells is dependent of both mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 357:402-407.

Myerburg, M.M., M.B. Butterworth, E.E. McKenna, K.W. Peters, R.A. Frizzell, T.R. Kleyman, and J.M. Pilewski. 2006. Airway surface liquid volume regulates ENaC by altering the serine protease-protease inhibitor balance: a mechanism for sodium hyperabsorption in cystic fibrosis. *J Biol Chem*. 281:27942-27949.

Nakamura, H., K. Yoshimura, N.G. McElvaney, and R.G. Crystal. 1992. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest*. 89:1478-1484.

Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 2:279-289.

Nazareth, D., and M. Walshaw. 2013. A review of renal disease in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 4:309-317.

Nelson, R.J. 2004. Seasonal immune function and sickness responses. *Trends Immunol*. 25:187-192.

Nelson, S., C.M. Mason, J. Kolls, and W.R. Summer. 1995. Pathophysiology of pneumonia. *Clin Chest Med*. 16:1-12.

Neumann, M., and M. Naumann. 2007. Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *Faseb J*. 21:2642-2654.

Newcomb, D.C., U. Sajjan, S. Nanua, Y. Jia, A.M. Goldsmith, J.K. Bentley, and M.B. Hershenson. 2005. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for rhinovirus-induced airway epithelial cell interleukin-8 expression. *J Biol Chem*. 280:36952-36961.

Ngamcherdtrakul, W., D.J. Castro, S. Gu, J. Morry, M. Reda, J.W. Gray, and W. Yantasee. 2016. Current development of targeted oligonucleotide-based cancer therapies: Perspective on HER2-positive breast cancer treatment. *Cancer Treat Rev*. 45:19-29.

Nguyen, D.D., and S. Chang. 2017. Development of Novel Therapeutic Agents by Inhibition of Oncogenic MicroRNAs. *Int J Mol Sci*. 19.

Norez, C., F. Antigny, F. Becq, and C. Vandebrouck. 2006. Maintaining Low Ca Level in the Endoplasmic Reticulum Restores Abnormal Endogenous F508del-CFTR Trafficking in Airway Epithelial Cells. *Traffic*. 7:562-573.

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

O'Riordan, S.M., M.T. Dattani, and P.C. Hindmarsh. 2010. Cystic fibrosis-related diabetes in childhood. *Horm Res Paediatr*. 73:15-24.

O'Shea, D., and J. O'Connell. 2014. Cystic fibrosis related diabetes. *Curr Diab Rep*. 14:511.

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

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

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

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

Okiyoneda, T., H. Barriere, M. Bagdany, W.M. Rabeh, K. Du, J. Hohfeld, J.C. Young, and G.L. Lukacs. 2010. Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. *Science*. 329:805-810.

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

Oren, Y.S., I.M. Pranke, B. Kerem, and I. Sermet-Gaudelus. 2017. The suppression of premature termination codons and the repair of splicing mutations in CFTR. *Curr Opin Pharmacol*. 34:125-131.

Osika, E., J.M. Cavaillon, K. Chadelat, M. Boule, C. Fitting, G. Tournier, and A. Clement. 1999. Distinct sputum cytokine profiles in cystic fibrosis and other chronic inflammatory airway disease. *Eur.Respir.J.* 14:339-346.

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

Ozsolak, F., L.L. Poling, Z. Wang, H. Liu, X.S. Liu, R.G. Roeder, X. Zhang, J.S. Song, and D.E. Fisher. 2008. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev*. 22:3172-3183.

Paccou, J., N. Zeboulon, C. Combescure, L. Gossec, and B. Cortet. 2010. The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis. *Calcif Tissue Int*. 86:1-7.

Pahl, H.L., and P.A. Baeuerle. 1996. Activation of NF-kappa B by ER stress requires both Ca2+ and reactive oxygen intermediates as messengers. *FEBS Lett*. 392:129-136.

Pal, D., S. Dasgupta, R. Kundu, S. Maitra, G. Das, S. Mukhopadhyay, S. Ray, S.S. Majumdar, and S. Bhattacharya. 2012. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med*. 18:1279-1285.

Pashaei, E., E. Pashaei, M. Ahmady, M. Ozen, and N. Aydin. 2017. Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy. *PLoS One*. 12:e0179543.

Pellestor, F., P. Paulasova, M. Macek, and S. Hamamah. 2005. [The peptide nucleic acids (PNAs): "high-tech" probes for genetic and molecular cytogenetic investigations]. *Med Sci (Paris)*. 21:753-758.

Perez-Vilar, J., and R.C. Boucher. 2004. Reevaluating gel-forming mucins' roles in cystic fibrosis lung disease. *Free Radic Biol Med*. 37:1564-1577.

Perez, A., A.C. Issler, C.U. Cotton, T.J. Kelley, A.S. Verkman, and P.B. Davis. 2007. CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 292:L383-395.

Peterson, S.M., J.A. Thompson, M.L. Ufkin, P. Sathyanarayana, L. Liaw, and C.B. Congdon. 2014. Common features of microRNA target prediction tools. *Front Genet*. 5:23.

Petit-Bertron, A.F., O. Tabary, H. Corvol, J. Jacquot, A. Clement, J.M. Cavaillon, and M. Adib-Conquy. 2008a. Circulating and airway neutrophils in cystic fibrosis display different TLR expression and responsiveness to interleukin-10. *Cytokine*. 41:54-60.

Petit-Bertron, A.F., O. Tabary, H. Corvol, J. Jacquot, A. Cment, J.M. Cavaillon, and M. Adib-Conquy. 2008b. Circulating and airway neutrophils in cystic fibrosis display different TLR expression and responsiveness to interleukin-10. *Cytokine*. 41:54-60.

Phua, Y.L., K.H. Chen, S.L. Hemker, A.K. Marrone, A.J. Bodnar, X. Liu, A. Clugston, D. Kostka, M.B. Butterworth, and J. Ho. 2019. Loss of miR-17~92 results in dysregulation of Cftr in nephron progenitors. *Am J Physiol Renal Physiol*.

Pibiri, I., L. Lentini, R. Melfi, G. Gallucci, A. Pace, A. Spinello, G. Barone, and A. Di Leonardo. 2015. Enhancement of premature stop codon readthrough in the CFTR gene by Ataluren (PTC124) derivatives. *Eur J Med Chem*. 101:236-244.

Pibiri, I., L. Lentini, M. Tutone, R. Melfi, A. Pace, and A. Di Leonardo. 2016. Exploring the readthrough of nonsense mutations by non-acidic Ataluren analogues selected by ligand-based virtual screening. *Eur J Med Chem*. 122:429-435.

Pierdomenico, A.M., S. Patruno, M. Codagnone, F. Simiele, V.C. Mari, R. Plebani, A. Recchiuti, and M. Romano. 2017. microRNA-181b is increased in cystic fibrosis cells and impairs lipoxin A4 receptor-dependent mechanisms of inflammation resolution and antimicrobial defense. *Sci Rep*. 7:13519.

Pillarisetti, N., E. Williamson, B. Linnane, B. Skoric, C.F. Robertson, P. Robinson, J. Massie, G.L. Hall, P. Sly, S. Stick, S. Ranganathan, and F. Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic. 2011. Infection, inflammation, and lung function decline in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 184:75-81.

Pittman, J.E., K.M. Wylie, K. Akers, G.A. Storch, J. Hatch, J. Quante, K.B. Frayman, N. Clarke, M. Davis, S.M. Stick, G.L. Hall, G. Montgomery, S. Ranganathan, S.D. Davis, T.W. Ferkol, and F. Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic. 2017. Association of Antibiotics, Airway Microbiome, and Inflammation in Infants with Cystic Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc*. 14:1548-1555.

Place, R.F., L.C. Li, D. Pookot, E.J. Noonan, and R. Dahiya. 2008. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:1608-1613.

Plasschaert, L.W., R. Zilionis, R. Choo-Wing, V. Savova, J. Knehr, G. Roma, A.M. Klein, and A.B. Jaffe. 2018. A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature*. 560:377-381.

Poliseno, L., L. Salmena, J. Zhang, B. Carver, W.J. Haveman, and P.P. Pandolfi. 2010. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*. 465:1033-1038.

Pollard, A.J., A. Currie, C.M. Rosenberger, J.P. Heale, B.B. Finlay, and D.P. Speert. 2004. Differential post-transcriptional activation of human phagocytes by different Pseudomonas aeruginosa isolates. *Cell Microbiol*. 6:639-650.

Pollard, H.B., X.D. Ji, C. Jozwik, and D.M. Jacobowitz. 2005. High abundance protein profiling of cystic fibrosis lung epithelial cells. *Proteomics*. 5:2210-2226.

Prayle, A., A. Watson, H. Fortnum, and A. Smyth. 2010. Side effects of aminoglycosides on the kidney, ear and balance in cystic fibrosis. *Thorax*. 65:654-658.

Pritchard, C.C., H.H. Cheng, and M. Tewari. 2012. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*. 13:358-369.

Puchelle, E., P. Le Simple, R. Hajj, and C. Coraux. 2006. [Regeneration of injured airway epithelium]. *Ann Pharm Fr*. 64:107-113.

Punga, T., R. Le Panse, M. Andersson, F. Truffault, S. Berrih-Aknin, and A.R. Punga. 2014. Circulating miRNAs in myasthenia gravis: miR-150-5p as a new potential biomarker. *Ann Clin Transl Neurol*. 1:49-58.

Quon, B.S., and S.M. Rowe. 2016. New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis. *BMJ*. 352:i859.

Rab, A., R. Bartoszewski, A. Jurkuvenaite, J. Wakefield, J.F. Collawn, and Z. Bebok. 2007. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response regulate genomic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. 292:C756-766.

Rafferty, S., N. Alcolado, C. Norez, F. Chappe, S. Pelzer, F. Becq, and V. Chappe. 2009. Rescue of functional F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by vasoactive intestinal peptide in the human nasal epithelial cell line JME/CF15. *J Pharmacol Exp Ther*. 331:2-13.

Ramachandran, S., P.H. Karp, P. Jiang, L.S. Ostedgaard, A.E. Walz, J.T. Fisher, S. Keshavjee, K.A. Lennox, A.M. Jacobi, S.D. Rose, M.A. Behlke, M.J. Welsh, Y. Xing, and P.B. McCray, Jr. 2012. A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and DeltaF508 mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:13362-13367.

Ramachandran, S., P.H. Karp, S.R. Osterhaus, P. Jiang, C. Wohlford-Lenane, K.A. Lennox, A.M. Jacobi, K. Praekh, S.D. Rose, M.A. Behlke, Y. Xing, M.J. Welsh, and P.B. McCray, Jr. 2013. Post-Transcriptional Regulation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Expression and Function by MicroRNAs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 49:544-551.

Ramphal, R., V. Balloy, M. Huerre, M. Si-Tahar, and M. Chignard. 2005. TLRs 2 and 4 are not involved in hypersusceptibility to acute Pseudomonas aeruginosa lung infections. *J Immunol*. 175:3927-3934.

Ramsey, B.W., J. Davies, N.G. McElvaney, E. Tullis, S.C. Bell, P. Dřevínek, M. Griese, E.F. McKone, C.E. Wainwright, M.W. Konstan, R. Moss, F. Ratjen, I. Sermet-Gaudelus, S.M. Rowe, Q. Dong, S. Rodriguez, K. Yen, C. Ordoñez, J.S. Elborn, and V.-.-S. Group. 2011. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med*. 365:1663-1672.

Rao, S., V. Sigl, R.A. Wimmer, M. Novatchkova, A. Jais, G. Wagner, S. Handschuh, I. Uribesalgo, A. Hagelkruys, I. Kozieradzki, L. Tortola, R. Nitsch, S.J. Cronin, M. Orthofer, D. Branstetter, J. Canon, J. Rossi, M. D'Arcangelo, J. Botling, P. Micke, L. Fleur, K. Edlund, M. Bergqvist, S. Ekman, T. Lendl, H. Popper, H. Takayanagi, L. Kenner, F.R. Hirsch, W. Dougall, and J.M. Penninger. 2017. RANK rewires energy homeostasis in lung cancer cells and drives primary lung cancer. *Genes Dev*. 31:2099-2112.

Raoof, A.A., P. Chiu, Z. Ramtoola, I.K. Cumming, C. Teng, S.P. Weinbach, G.E. Hardee, A.A. Levin, and R.S. Geary. 2004. Oral bioavailability and multiple dose tolerability of an antisense oligonucleotide tablet formulated with sodium caprate. *J Pharm Sci*. 93:1431-1439.

Ratner, A.J., R. Bryan, A. Weber, S. Nguyen, D. Barnes, A. Pitt, S. Gelber, A. Cheung, and A. Prince. 2001. Cystic fibrosis pathogens activate Ca2+-dependent mitogen-activated protein kinase signaling pathways in airway epithelial cells. *J Biol Chem*. 276:19267-19275.

Ray, A., and B. Norden. 2000. Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *FASEB J*. 14:1041-1060.

Reddi, K., S.B. Phagoo, K.D. Anderson, and D. Warburton. 2003. Burkholderia cepacia-induced IL-8 gene expression in an alveolar epithelial cell line: signaling through CD14 and mitogen-activated protein kinase. *Pediatr Res*. 54:297-305.

Reddy, S.A., J.H. Huang, and W.S. Liao. 1997. Phosphatidylinositol 3-kinase in interleukin 1 signaling. Physical interaction with the interleukin 1 receptor and requirement in NFkappaB and AP-1 activation. *J Biol Chem*. 272:29167-29173.

Reilly, R., M.S. Mroz, E. Dempsey, K. Wynne, S.J. Keely, E.F. McKone, C. Hiebel, C. Behl, and J.A. Coppinger. 2017. Targeting the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in Cystic Fibrosis. *Sci Rep*. 7:7642.

Reiniger, N., M.M. Lee, F.T. Coleman, C. Ray, D.E. Golan, and G.B. Pier. 2007. Resistance to Pseudomonas aeruginosa chronic lung infection requires cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-modulated interleukin-1 (IL-1) release and signaling through the IL-1 receptor. *Infect Immun*. 75:1598-1608.

Ribeiro, C.M., A.M. Paradiso, U. Schwab, J. Perez-Vilar, L. Jones, W. O'Neal, and R.C. Boucher. 2005. Chronic airway infection/inflammation induces a Ca2+i-dependent hyperinflammatory response in human cystic fibrosis airway epithelia. *J Biol Chem*. 280:17798-17806.

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

Ripa, P., I. Robertson, D. Cowley, M. Harris, I.B. Masters, and A.M. Cotterill. 2002. The relationship between insulin secretion, the insulin-like growth factor axis and growth in children with cystic fibrosis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 56:383-389.

Robay, A., G. Toumaniantz, V. Leblais, and C. Gauthier. 2005. Transfected beta3- but not beta2-adrenergic receptors regulate cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity via a new pathway involving the mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases. *Mol Pharmacol*. 67:648-654.

Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, J.L. Ashurst, and A. Bradley. 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research*. 14:1902-1910.

Rollins, B.J. 1997. Chemokines. *Blood*. 90:909-928.

Rommens, J.M., M.C. Iannuzzi, B. Kerem, M.L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J.L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka, and et al. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. 245:1059-1065.

Ross. 2006. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins. *Histology*.

Rossi, S.W., M.Y. Kim, A. Leibbrandt, S.M. Parnell, W.E. Jenkinson, S.H. Glanville, F.M. McConnell, H.S. Scott, J.M. Penninger, E.J. Jenkinson, P.J. Lane, and G. Anderson. 2007. RANK signals from CD4(+)3(-) inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. *J Exp Med*. 204:1267-1272.

Rottner, M., J.M. Freyssinet, and M.C. Martinez. 2009. Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. *Respir Res*. 10:23.

Rowe, S.M., P. Sloane, L.P. Tang, K. Backer, M. Mazur, J. Buckley-Lanier, I. Nudelman, V. Belakhov, Z. Bebok, E. Schwiebert, T. Baasov, and D.M. Bedwell. 2011. Suppression of CFTR premature termination codons and rescue of CFTR protein and function by the synthetic aminoglycoside NB54. *J Mol Med (Berl)*. 89:1149-1161.

Rowntree, R.K., and A. Harris. 2003. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet*. 67:471-485.

Ruan, Y.C., J.H. Guo, X. Liu, R. Zhang, L.L. Tsang, J.D. Dong, H. Chen, M.K. Yu, X. Jiang, X.H. Zhang, K.L. Fok, Y.W. Chung, H. Huang, W.L. Zhou, and H.C. Chan. 2012. Activation of the epithelial Na+ channel triggers prostaglandin E(2) release and production required for embryo implantation. *Nat Med*. 18:1112-1117.

Ruffin, M., M. Voland, S. Marie, M. Bonora, E. Blanchard, S. Blouquit-Laye, E. Naline, P. Puyo, P. Le Rouzic, L. Guillot, H. Corvol, A. Clement, and O. Tabary. 2013. Anoctamin 1 dysregulation alters bronchial epithelial repair in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. 1832:2340-2351.

Rupaimoole, R., and F.J. Slack. 2017. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*.

Saadane, A., S. Masters, J. DiDonato, J. Li, and M. Berger. 2007. Parthenolide inhibits IkappaB kinase, NF-kappaB activation, and inflammatory response in cystic fibrosis cells and mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 36:728-736.

Saadane, A., J. Soltys, and M. Berger. 2006. Acute Pseudomonas challenge in cystic fibrosis mice causes prolonged nuclear factor-kappa B activation, cytokine secretion, and persistent lung inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 117:1163-1169.

Sadikot, R.T., J.W. Christman, and T.S. Blackwell. 2004. Molecular targets for modulating lung inflammation and injury. *Curr Drug Targets*. 5:581-588.

Sagel, S.D., J.F. Chmiel, and M.W. Konstan. 2007. Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proc Am Thorac Soc*. 4:406-417.

Saini, H.K., A.J. Enright, and S. Griffiths-Jones. 2008. Annotation of mammalian primary microRNAs. *BMC Genomics*. 9:564.

Salmena, L., L. Poliseno, Y. Tay, L. Kats, and P.P. Pandolfi. 2011. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell*. 146:353-358.

Sandhaus, R.A., and G. Turino. 2013. Neutrophil elastase-mediated lung disease. *COPD*. 10 Suppl 1:60-63.

Sands, D. 2013. Transepithelial nasal potential difference (NPD) measurements in cystic fibrosis (CF). *Med Wieku Rozwoj*. 17:13-17.

Scheid, P., L. Kempster, U. Griesenbach, J.C. Davies, A. Dewar, P.P. Weber, W.H. Colledge, M.J. Evans, D.M. Geddes, and E.W. Alton. 2001. Inflammation in cystic fibrosis airways: relationship to increased bacterial adherence. *Eur.Respir.J.* 17:27-35.

Schmeck, B., K. Moog, J. Zahlten, V. van Laak, P.D. N'Guessan, B. Opitz, S. Rosseau, N. Suttorp, and S. Hippenstiel. 2006. Streptococcus pneumoniae induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1 -dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells. *Respir Res*. 7:98.

Schreiber, R., R. Nitschke, R. Greger, and K. Kunzelmann. 1999. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells. *J Biol Chem*. 274:11811-11816.

Schreiber, R., H. Pavenstadt, R. Greger, and K. Kunzelmann. 2000. Aquaporin 3 cloned from Xenopus laevis is regulated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett*. 475:291-295.

Schultz, N.A., C. Dehlendorff, B.V. Jensen, J.K. Bjerregaard, K.R. Nielsen, S.E. Bojesen, D. Calatayud, S.E. Nielsen, M. Yilmaz, N.H. Hollander, K.K. Andersen, and J.S. Johansen. 2014. MicroRNA biomarkers in whole blood for detection of pancreatic cancer. *JAMA*. 311:392-404.

Schuster, A., C. Haliburn, G. Doring, M.H. Goldman, and G. Freedom Study. 2013. Safety, efficacy and convenience of colistimethate sodium dry powder for inhalation (Colobreathe DPI) in patients with cystic fibrosis: a randomised study. *Thorax*. 68:344-350.

Schwank, G., B.K. Koo, V. Sasselli, J.F. Dekkers, I. Heo, T. Demircan, N. Sasaki, S. Boymans, E. Cuppen, C.K. van der Ent, E.E. Nieuwenhuis, J.M. Beekman, and H. Clevers. 2013. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell stem cell*. 13:653-658.

Seidler, U., I. Blumenstein, A. Kretz, D. Viellard-Baron, H. Rossmann, W.H. Colledge, M. Evans, R. Ratcliff, and M. Gregor. 1997. A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca(2+)-dependent HCO3- secretion. *J Physiol*. 505 (Pt 2):411-423.

Seitz, H. 2009. Redefining microRNA targets. *Curr Biol*. 19:870-873.

Selbach, M., B. Schwanhausser, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin, and N. Rajewsky. 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 455:58-63.

Sen, R., and D. Baltimore. 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 46:705-716.

Sermet-Gaudelus, I., A. Munck, M. Rota, M. Roussey, D. Feldmann, T. Nguyen-Khoa, and m. Groupe de travail "Depistage neonatal" de la Federation des centres de ressources et de competences de la. 2010. [French guidelines for sweat test practice and interpretation for cystic fibrosis neonatal screening]. *Arch Pediatr*. 17:1349-1358.

Sermet-Gaudelus, I., J.C. Souberbielle, J.C. Ruiz, S. Vrielynck, B. Heuillon, I. Azhar, A. Cazenave, E. Lawson-Body, F. Chedevergne, and G. Lenoir. 2007. Low bone mineral density in young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 175:951-957.

Serohijos, A.W., T. Hegedus, A.A. Aleksandrov, L. He, L. Cui, N.V. Dokholyan, and J.R. Riordan. 2008. Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:3256-3261.

Sharma, M., F. Pampinella, C. Nemes, M. Benharouga, J. So, K. Du, K.G. Bache, B. Papsin, N. Zerangue, H. Stenmark, and G.L. Lukacs. 2004. Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J Cell Biol*. 164:923-933.

Shead, E.F., C.S. Haworth, H. Barker, D. Bilton, and J.E. Compston. 2010. Osteoclast function, bone turnover and inflammatory cytokines during infective exacerbations of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 9:93-98.

Sheppard, D.N., and M.J. Welsh. 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev*. 79:S23-45.

Shi, J., H. Liu, H. Wang, and X. Kong. 2016. MicroRNA Expression Signature in Degenerative Aortic Stenosis. *BioMed research international*. 2016:4682172.

Si-Tahar, M., L. Touqui, and M. Chignard. 2009. Innate immunity and inflammation--two facets of the same anti-infectious reaction. *Clin Exp Immunol*. 156:194-198.
Sibille, Y., and H.Y. Reynolds. 1990. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis*. 141:471-501.
Singh, G., and S.L. Katyal. 1997. Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10). *Am J Respir Cell Mol Biol*. 17:141-143.
Sinn, P.L., A.C. Arias, K.A. Brogden, and P.B. McCray, Jr. 2008. Lentivirus vector can be readministered to nasal epithelia without blocking immune responses. *J Virol*. 82:10684-10692.
Siwamogsatham, O., J.A. Alvarez, and V. Tangpricha. 2014. Diagnosis and treatment of endocrine comorbidities in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 21:422-429.
Sizemore, N., S. Leung, and G.R. Stark. 1999. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit. *Mol Cell Biol*. 19:4798-4805.
Slattery, M.L., J.S. Herrick, L.E. Mullany, E. Wolff, M.D. Hoffman, D.F. Pellatt, J.R. Stevens, and R.K. Wolff. 2016. Colorectal tumor molecular phenotype and miRNA: expression profiles and prognosis. *Mod Pathol*. 29:915-927.
Slaymaker, I.M., L. Gao, B. Zetsche, D.A. Scott, W.X. Yan, and F. Zhang. 2016. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 351:84-88.
Sleigh, M.A., J.R. Blake, and N. Liron. 1988. The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis*. 137:726-741.
Slevogt, H., B. Schmeck, C. Jonatat, J. Zahlten, W. Beermann, V. van Laak, B. Opitz, S. Dietel, P.D. N'Guessan, S. Hippenstiel, N. Suttorp, and J. Seybold. 2006. Moraxella catarrhalis induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 290:L818-826.
Smith, J.J., S.M. Travis, E.P. Greenberg, and M.J. Welsh. 1996. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell*. 85:229-236.
Song, R., D.R. Catchpoole, P.J. Kennedy, and J. Li. 2015. Identification of lung cancer miRNA-miRNA co-regulation networks through a progressive data refining approach. *J Theor Biol*. 380:271-279.
Sonneville, F., M. Ruffin, C. Coraux, N. Rousselet, P.L. Rouzic, S. Blouquit-Laye, H. Corvol, and O. Tabary. 2017. MicroRNA-9 downregulates the ANO1 chloride channel and contributes to cystic fibrosis lung pathology. *Nature communications*. 8:710.
Southern, K.W., P.M. Barker, A. Solis-Moya, and L. Patel. 2012. Macrolide antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 11:CD002203.
Spielberg, D.R., and J.P. Clancy. 2016. Cystic Fibrosis and Its Management Through Established and Emerging Therapies. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 17:155-175.
Srivastava, M., O. Eidelman, C. Joswik, C. Paweletz, W. Huang, P.L. Zeitlin, and H.B. Pollard. 2006. Serum proteomic signature for cystic fibrosis using an antibody microarray platform. *Mol Genet Metab*.
Stephenson, A.L., S. Stanojevic, J. Sykes, and P.R. Burgel. 2017. The changing epidemiology and demography of cystic fibrosis. *Presse Med*. 46:e87-e95.
Stolzenburg, L.R., S. Wachtel, H. Dang, and A. Harris. 2016. miR-1343 attenuates pathways of fibrosis by targeting the TGF-beta receptors. *Biochem J*. 473:245-256.
Sun, L., J.M. Rommens, H. Corvol, W. Li, X. Li, T.A. Chiang, F. Lin, R. Dorfman, P.F. Busson, R.V. Parekh, D. Zelenika, S.M. Blackman, M. Corey, V.K. Doshi, L. Henderson, K.M. Naughton, W.K. O'Neal, R.G. Pace, J.R. Stonebraker, S.D. Wood, F.A. Wright, J. Zielenski, A. Clement, M.L. Drumm, P.Y. Boelle, G.R. Cutting, M.R. Knowles, P.R. Durie, and L.J. Strug. 2012. Multiple apical plasma membrane constituents are associated with susceptibility to meconium ileus in individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet*. 44:562-569.
Sun, X., Y.C. Ruan, J. Guo, H. Chen, L.L. Tsang, X. Zhang, X. Jiang, and H.C. Chan. 2014. Regulation of miR-101/miR-199a-3p by the epithelial sodium channel during embryo implantation: involvement of CREB phosphorylation. *Reproduction*. 148:559-568.
Suter, S., I. Chevallier, K.H. Krause, and D.P. Lew. 1989. Effect of cyclic adenosine monophosphate elevations on functional responses of polymorphonuclear leukocytes from patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 6:237-241.
Suter, S., U.B. Schaad, L. Roux, U.E. Nydegger, and F.A. Waldvogel. 1984. Granulocyte neutral proteases and Pseudomonas elastase as possible causes of airway damage in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 149:523-531.
Suzuki, S., R.G. Sargent, B. Illek, H. Fischer, A. Esmaeili-Shandiz, M.J. Yezzi, A. Lee, Y. Yang, S. Kim, P. Renz, Z. Qi, J. Yu, M.O. Muench, A.I. Beyer, A.O. Guimaraes, L. Ye, J. Chang, E.J. Fine, T.J. Cradick, G. Bao, M. Rahdar, M.H. Porteus, T. Shuto, H. Kai, Y.W. Kan, and D.C. Gruenert. 2016. TALENs Facilitate Single-step Seamless SDF Correction of F508del CFTR in Airway Epithelial Submucosal Gland Cell-derived CF-iPSCs. *Mol Ther Nucleic Acids*. 5:e273.

Swiatecka-Urban, A., A. Brown, S. Moreau-Marquis, J. Renuka, B. Coutermarsh, R. Barnaby, K.H. Karlson, T.R. Flotte, M. Fukuda, G.M. Langford, and B.A. Stanton. 2005. The short apical membrane half-life of rescued {Delta}F508-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) results from accelerated endocytosis of {Delta}F508-CFTR in polarized human airway epithelial cells. *J Biol Chem*. 280:36762-36772.

Syeda, F., H.Y. Liu, E. Tullis, M. Liu, A.S. Slutsky, and H. Zhang. 2008a. Differential signaling mechanisms of HNP-induced IL-8 production in human lung epithelial cells and monocytes. *J Cell Physiol*. 214:820-827.

Syeda, F., E. Tullis, A.S. Slutsky, and H. Zhang. 2008b. Human neutrophil peptides upregulate expression of COX-2 and endothelin-1 by inducing oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 294:H2769-2774.

Tabary, O., E. Boncoeur, R. de Martin, R. Pepperkok, A. Clement, C. Schultz, and J. Jacquot. 2006a. Calcium-dependent regulation of NF-(kappa)B activation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell Signal*. 18:652-660.

Tabary, O., H. Corvol, E. Boncoeur, K. Chadelat, C. Fitting, J.M. Cavaillon, A. Clement, and J. Jacquot. 2006b. Adherence of airway neutrophils and inflammatory response are increased in CF airway epithelial cell-neutrophil interactions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 290:L588-596.

Tabary, O., S. Escotte, J.P. Couetil, D. Hubert, D. Dusser, E. Puchelle, and J. Jacquot. 1999a. Genistein inhibits constitutive and inducible NFkappaB activation and decreases IL-8 production by human cystic fibrosis bronchial gland cells. *Am J Pathol*. 155:473-481.

Tabary, O., S. Escotte, J.P. Couetil, D. Hubert, D. Dusser, E. Puchelle, and J. Jacquot. 2001. Relationship between IkappaBalpha deficiency, NFkappaB activity and interleukin-8 production in CF human airway epithelial cells. *Pflugers Arch*. 443 Suppl 1:S40-44.

Tabary, O., S. Escotte, J.C. Yvin, E. Puchelle, and J. Jacquot. 1999b. Osmolarity of airway surface liquid regulates the IL-8 production of airway epithelial cells through NF-B-kappa transcriptional activity. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 159:A508.

Tabary, O., C. Muselet, M.C. Miesch, J.C. Yvin, A. Clement, and J. Jacquot. 2003. Reduction of chemokine IL-8 and RANTES expression in human bronchial epithelial cells by a sea-water derived saline through inhibited nuclear factor-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 309:310-316.

Tabary, O., J.M. Zahm, J. Hinnrasky, J.P. Couetil, P. Cornillet, M. Guenounou, D. Gaillard, E. Puchelle, and J. Jacquot. 1998. Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro. *Am J Pathol*. 153:921-930.

Taggart, C., R.J. Coakley, P. Greally, G. Canny, S.J. O'Neill, and N.G. McElvaney. 2000. Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 278:L33-41.

Takabayshi, K., M. Corr, T. Hayashi, V. Redecke, L. Beck, D. Guiney, D. Sheppard, and E. Raz. 2006. Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds. *Immunity*. 24:475-487.

Takamizawa, J., H. Konishi, K. Yanagisawa, S. Tomida, H. Osada, H. Endoh, T. Harano, Y. Yatabe, M. Nagino, Y. Nimura, T. Mitsudomi, and T. Takahashi. 2004. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 64:3753-3756.

Takeshita, F., L. Patrawala, M. Osaki, R.U. Takahashi, Y. Yamamoto, N. Kosaka, M. Kawamata, K. Kelnar, A.G. Bader, D. Brown, and T. Ochiya. 2010. Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther*. 18:181-187.

Takuwa, N., W. Zhou, M. Kumada, and Y. Takuwa. 1995. Involvement of intact inositol-1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca2+ stores in cell cycle progression at the G1/S boundary in serum-stimulated human fibroblasts. *FEBS Lett*. 360:173-176.

Tamanini, A., R. Rolfini, E. Nicolis, P. Melotti, and G. Cabrini. 2003. MAP kinases and NF-kappaB collaborate to induce ICAM-1 gene expression in the early phase of adenovirus infection. *Virology*. 307:228-242.

Tarran, R., S. Donaldson, and R.C. Boucher. 2007. Rationale for hypertonic saline therapy for cystic fibrosis lung disease. *Semin Respir Crit Care Med*. 28:295-302.

Taylor, P.R., T.L. Bonfield, J.F. Chmiel, and E. Pearlman. 2016. Neutrophils from F508del cystic fibrosis patients produce IL-17A and express IL-23 - dependent IL-17RC. *Clin Immunol*. 170:53-60.

Tazi, M.F., D.A. Dakhlallah, K. Caution, M.M. Gerber, S.W. Chang, H. Khalil, B.T. Kopp, A.E. Ahmed, K. Krause, I. Davis, C. Marsh, A.E. Lovett-Racke, L.S. Schlesinger, E. Cormet-Boyaka, and A.O. Amer. 2016. Elevated Mirc1/Mir17-92 cluster expression negatively regulates autophagy and CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) function in CF macrophages. *Autophagy*. 12:2026-2037.

Tessel, M.A., A.L. Benham, N.L. Krett, S.T. Rosen, and P.H. Gunaratne. 2011. Role for microRNAs in regulating glucocorticoid response and resistance in multiple myeloma. *Horm Cancer*. 2:182-189.

Tirouvanziam, R., S. de Bentzmann, C. Hubeau, J. Hinnrasky, J. Jacquot, B. Peault, and E. Puchelle. 2000. Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 23:121-127.

Tirouvanziam, R., Y. Gernez, C.K. Conrad, R.B. Moss, I. Schrijver, C.E. Dunn, Z.A. Davies, and L.A. Herzenberg. 2008. Profound functional and signaling changes in viable inflammatory neutrophils homing to cystic fibrosis airways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:4335-4339.

Tirouvanziam, R., I. Khazaal, and B. Peault. 2002. Primary inflammation in human cystic fibrosis small airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 283:L445-451.

Tomari, Y., and P.D. Zamore. 2005. MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner. *Curr Biol*. 15:R61-64.

Trang, P., P.P. Medina, J.F. Wiggins, L. Ruffino, K. Kelnar, M. Omotola, R. Homer, D. Brown, A.G. Bader, J.B. Weidhaas, and F.J. Slack. 2010. Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene*. 29:1580-1587.

Truneh, A., F. Albert, P. Golstein, and A.M. Schmitt-Verhulst. 1985. Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature*. 313:318-320.

Tsai, J.R., I.W. Chong, C.C. Chen, S.R. Lin, C.C. Sheu, and J.J. Hwang. 2006. Mitogen-activated protein kinase pathway was significantly activated in human bronchial epithelial cells by nicotine. *DNA Cell Biol*. 25:312-322.

Turjanski, A.G., J.P. Vaque, and J.S. Gutkind. 2007. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*. 26:3240-3253.

Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J.J. Lee, and J.O. Lotvall. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 9:654-659.

van der Ree, M.H., A.J. van der Meer, J. de Bruijne, R. Maan, A. van Vliet, T.M. Welzel, S. Zeuzem, E.J. Lawitz, M. Rodriguez-Torres, V. Kupcova, A. Wiercinska-Drapalo, M.R. Hodges, H.L. Janssen, and H.W. Reesink. 2014. Long-term safety and efficacy of microRNA-targeted therapy in chronic hepatitis C patients. *Antiviral Res*. 111:53-59.

Van Goor, F., S. Hadida, P.D. Grootenhuis, B. Burton, D. Cao, T. Neuberger, A. Turnbull, A. Singh, J. Joubran, A. Hazlewood, J. Zhou, J. McCartney, V. Arumugam, C. Decker, J. Yang, C. Young, E.R. Olson, J.J. Wine, R.A. Frizzell, M. Ashlock, and P. Negulescu. 2009. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:18825-18830.

Van Goor, F., S. Hadida, P.D. Grootenhuis, B. Burton, J.H. Stack, K.S. Straley, C.J. Decker, M. Miller, J. McCartney, E.R. Olson, J.J. Wine, R.A. Frizzell, M. Ashlock, and P.A. Negulescu. 2011. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:18843-18848.

Van Goor, F., K.S. Straley, D. Cao, J. Gonzalez, S. Hadida, A. Hazlewood, J. Joubran, T. Knapp, L.R. Makings, M. Miller, T. Neuberger, E. Olson, V. Panchenko, J. Rader, A. Singh, J.H. Stack, R. Tung, P.D. Grootenhuis, and P. Negulescu. 2006. Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 290:L1117-1130.

Vandivier, R.W., V.A. Fadok, P.R. Hoffmann, D.L. Bratton, C. Penvari, K.K. Brown, J.D. Brain, F.J. Accurso, and P.M. Henson. 2002. Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *J Clin Invest*. 109:661-670.

Vanscoy, L.L., S.M. Blackman, J.M. Collaco, A. Bowers, T. Lai, K. Naughton, M. Algire, R. McWilliams, S. Beck, J. Hoover-Fong, A. Hamosh, D. Cutler, and G.R. Cutting. 2007. Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 175:1036-1043.

Vanthanouvong, V., I. Kozlova, M. Johannesson, E. Naas, S.L. Nordvall, A. Dragomir, and G.M. Roomans. 2006. Composition of nasal airway surface liquid in cystic fibrosis and other airway diseases determined by X-ray microanalysis. *Microsc Res Tech*. 69:271-276.

Varshney, A., J.J. Panda, A.K. Singh, N. Yadav, C. Bihari, S. Biswas, S.K. Sarin, and V.S. Chauhan. 2018. Targeted delivery of microRNA-199a-3p using self-assembled dipeptide nanoparticles efficiently reduces hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*. 67:1392-1407.

Vasudevan, S., and J.A. Steitz. 2007. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*. 128:1105-1118.

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, and G.L. Lukacs. 2016. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell*. 27:424-433.

Velard, F., M. Delion, O. Tabary, C. Giuillaume, S. Gangloff, F. Le Pimpec-Barthes, I. Sermet-Gaudelus, and J. Jacquot. 2015. BONE DISEASE IN CYSTIC FIBROSIS: EXPRESSION OF OSTEOCALCIN AND RANK-L/OPG RATIO IN HUMAN OSTEOBLASTS WITH THE F508DEL MUTATION IN CFTR. *Pediatric Pulmonology*. 50:416-416.

Velard, F., M.L. Jourdain, D. Abdallah, J. Jacquot, N. Ronan, Y. McCarthy, E. Flanagan, and B. Plant. 2018. Overexpression of RANK and M-CSFR in Monocytes of G551D-Bearing Patients with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 198:968-970.

Vella, M.C., E.Y. Choi, S.Y. Lin, K. Reinert, and F.J. Slack. 2004. The C. elegans microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev*. 18:132-137.

Venkatakrishnan, A., A.A. Stecenko, G. King, T.R. Blackwell, K.L. Brigham, J.W. Christman, and T.S. Blackwell. 2000. Exaggerated activation of nuclear factor-kappaB and altered IkappaB- beta processing in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 23:396-403.

Verhaeghe, C., K. Delbecque, L. de Leval, C. Oury, and V. Bours. 2007a. Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus. *J Cyst Fibros*. 6:304-308.

Verhaeghe, C., C. Remouchamps, B. Hennuy, A. Vanderplasschen, A. Chariot, S.P. Tabruyn, C. Oury, and V. Bours. 2007b. Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways. *Biochem Pharmacol*. 73:1982-1994.

Viart, V., A. Bergougnoux, J. Bonini, J. Varilh, R. Chiron, O. Tabary, N. Molinari, M. Claustres, and M. Taulan-Cadars. 2015. Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis. *Eur Respir J*.

Vickers, K.C., B.T. Palmisano, B.M. Shoucri, R.D. Shamburek, and A.T. Remaley. 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 13:423-433.

Vij, N., S. Mazur, and P.L. Zeitlin. 2009. CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. *PLoS ONE*. 4:e4664.

Voynow, J.A., B.M. Fischer, and S. Zheng. 2008. Proteases and cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 40:1238-1245.

Wahlestedt, C., P. Salmi, L. Good, J. Kela, T. Johnsson, T. Hokfelt, C. Broberger, F. Porreca, J. Lai, K. Ren, M. Ossipov, A. Koshkin, N. Jakobsen, J. Skouv, H. Oerum, M.H. Jacobsen, and J. Wengel. 2000. Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:5633-5638.

Wainwright, C.E., J.S. Elborn, B.W. Ramsey, G. Marigowda, X. Huang, M. Cipolli, C. Colombo, J.C. Davies, K. De Boeck, P.A. Flume, M.W. Konstan, S.A. McColley, K. McCoy, E.F. McKone, A. Munck, F. Ratjen, S.M. Rowe, D. Waltz, M.P. Boyle, Traffic, and T.S. Groups. 2015. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med*.

Waller, R., E.F. Goodall, M. Milo, J. Cooper-Knock, M. Da Costa, E. Hobson, M. Kazoka, H. Wollff, P.R. Heath, P.J. Shaw, and J. Kirby. 2017. Serum miRNAs miR-206, 143-3p and 374b-5p as potential biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neurobiol Aging*. 55:123-131.

Wang, L.P., Y.Z. Gao, B. Song, G. Yu, H. Chen, Z.W. Zhang, C.F. Yan, Y.L. Pan, and X.Y. Yu. 2019a. MicroRNAs in the Progress of Diabetic Nephropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019:3513179.

Wang, X., J. Zou, H. Chen, P. Zhang, Z. Lu, Z. You, and J. Sun. 2019b. Long noncoding RNA NORAD regulates cancer cell proliferation and migration in human osteosarcoma by endogenously competing with miR-199a-3p. *IUBMB Life*.

Wang, Z., X. Ma, Q. Cai, X. Wang, B. Yu, Q. Cai, B. liu, Z. Zhu, and C. Li. 2014. MiR-199a-3p promotes gastric cancer progression by targeting ZHX1. *FEBS Lett*. 588:4504-4512.

Ward, P.A. 2003. Acute lung injury: how the lung inflammatory response works. *Eur Respir J Suppl*. 44:22s-23s.

Wark, P.A., V. McDonald, and A.P. Jones. 2005. Nebulised hypertonic saline for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*:CD001506.

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

Weber, J.A., D.H. Baxter, S. Zhang, D.Y. Huang, K.H. Huang, M.J. Lee, D.J. Galas, and K. Wang. 2010. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 56:1733-1741.

Weber, S.A.T., R.M. Iyomasa, C.C. Correa, W.N.M. Florentino, and G.F. Ferrari. 2017. Nasal polyposis in cystic fibrosis: follow-up of children and adolescents for a 3-year period. *Braz J Otorhinolaryngol*. 83:677-682.

Weichselbaum, M., M.P. Sparrow, E.J. Hamilton, P.J. Thompson, and D.A. Knight. 2005. A confocal microscopic study of solitary pulmonary neuroendocrine cells in human airway epithelium. *Respir Res*. 6:115.

Weiland, M., X.H. Gao, L. Zhou, and Q.S. Mi. 2012. Small RNAs have a large impact: circulating microRNAs as biomarkers for human diseases. *RNA biology*. 9:850-859.

Weldon, S., P. McNally, D.F. McAuley, I.K. Oglesby, C.L. Wohlford-Lenane, J.A. Bartlett, C.J. Scott, N.G. McElvaney, C.M. Greene, P.B. McCray, Jr., and C.C. Taggart. 2014. miR-31 dysregulation in cystic fibrosis airways contributes to increased pulmonary cathepsin S production. *Am J Respir Crit Care Med*. 190:165-174.

Welsh, M.J. 1987. Electrolyte transport by airway epithelia. *Physiol Rev*. 67:1143-1184.

Welsh, M.J., and A.E. Smith. 1995. Cystic fibrosis. *Sci Am*. 273:52-59.

Wiggins, J.F., L. Ruffino, K. Kelnar, M. Omotola, L. Patrawala, D. Brown, and A.G. Bader. 2010. Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res*. 70:5923-5930.

Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. *Cell*. 75:855-862.

Wilczynska, A., and M. Bushell. 2015. The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death Differ*. 22:22-33.

Wilschanski, M., Y. Yahav, Y. Yaacov, H. Blau, L. Bentur, J. Rivlin, M. Aviram, T. Bdolah-Abram, Z. Bebok, L. Shushi, B. Kerem, and E. Kerem. 2003. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med*. 349:1433-1441.

Wiszniewski, L., L. Jornot, T. Dudez, A. Pagano, T. Rochat, J.S. Lacroix, S. Suter, and M. Chanson. 2006. Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 34:39-48.

Witko-Sarsat, V., L. Halbwachs-Mecarelli, A. Schuster, P. Nusbaum, I. Ueki, S. Canteloup, G. Lenoir, B. Descamps-Latscha, and J.A. Nadel. 1999. Proteinase 3, a potent secretagogue in airways, is present in cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 20:729-736.

Wong, P.Y. 1998. CFTR gene and male fertility. *Molecular human reproduction*. 4:107-110.

Wright, F.A., L.J. Strug, V.K. Doshi, C.W. Commander, S.M. Blackman, L. Sun, Y. Berthiaume, D. Cutler, A. Cojocaru, J.M. Collaco, M. Corey, R. Dorfman, K. Goddard, D. Green, J.W. Kent, Jr., E.M. Lange, S. Lee, W. Li, J. Luo, G.M. Mayhew, K.M. Naughton, R.G. Pace, P. Pare, J.M. Rommens, A. Sandford, J.R. Stonebraker, W. Sun, C. Taylor, L.L. Vanscoy, F. Zou, J. Blangero, J. Zielenski, W.K. O'Neal, M.L. Drumm, P.R. Durie, M.R. Knowles, and G.R. Cutting. 2011. Genome-wide association and linkage identify modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis at 11p13 and 20q13.2. *Nat Genet*. 43:539-546.

Wu, D., H.J. Huang, C.N. He, and K.Y. Wang. 2013. MicroRNA-199a-3p regulates endometrial cancer cell proliferation by targeting mammalian target of rapamycin (mTOR). *Int J Gynecol Cancer*. 23:1191-1197.

Wu, Y., M. Crawford, B. Yu, Y. Mao, S.P. Nana-Sinkam, and L.J. Lee. 2011. MicroRNA delivery by cationic lipoplexes for lung cancer therapy. *Mol Pharm*. 8:1381-1389.

Xu, J., T. Shao, N. Ding, Y. Li, and X. Li. 2017. miRNA-miRNA crosstalk: from genomics to phenomics. *Brief Bioinform*. 18:1002-1011.

Xu, Y., C. Tertilt, A. Krause, L.E. Quadri, R.G. Crystal, and S. Worgall. 2009. Influence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on expression of lipid metabolism-related genes in dendritic cells. *Respir Res*. 10:26.

Xue, X., V. Mutyam, L. Tang, S. Biswas, M. Du, L.A. Jackson, Y. Dai, V. Belakhov, M. Shalev, F. Chen, J. Schacht, J.B. R, T. Baasov, J. Hong, D.M. Bedwell, and S.M. Rowe. 2014. Synthetic aminoglycosides efficiently suppress cystic fibrosis transmembrane conductance regulator nonsense mutations and are enhanced by ivacaftor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 50:805-816.

Yamamoto, Y., and R.B. Gaynor. 2001. Role of the NF-kappaB pathway in the pathogenesis of human disease states. *Curr Mol Med*. 1:287-296.

Yan, W., W. Yang, Z. Liu, and G. Wu. 2018. Characterization of microRNA expression in primary human colon adenocarcinoma cells (SW480) and their lymph node metastatic derivatives (SW620). *Onco Targets Ther*. 11:4701-4709.

Yang, F., C. Feng, X. Zhang, J. Lu, and Y. Zhao. 2017. The Diverse Biological Functions of Neutrophils, Beyond the Defense Against Infections. *Inflammation*. 40:311-323.

Yang, W., T.P. Chendrimada, Q. Wang, M. Higuchi, P.H. Seeburg, R. Shiekhattar, and K. Nishikura. 2006. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol*. 13:13-21.

Yi, R., Y. Qin, I.G. Macara, and B.R. Cullen. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 17:3011-3016.

Yu, R.Z., J.S. Grundy, and R.S. Geary. 2013. Clinical pharmacokinetics of second generation antisense oligonucleotides. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 9:169-182.

Yu, R.Z., T.W. Kim, A. Hong, T.A. Watanabe, H.J. Gaus, and R.S. Geary. 2007. Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B-100. *Drug Metab Dispos*. 35:460-468.

Yui, S., Y. Nakatani, and M. Mikami. 2003. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biol Pharm Bull*. 26:753-760.

Zaman, K., V. Sawczak, A. Zaidi, M. Butler, D. Bennett, P. Getsy, M. Zeinomar, Z. Greenberg, M. Forbes, S. Rehman, V. Jyothikumar, K. DeRonde, A. Sattar, L. Smith, D. Corey, A. Straub, F. Sun, L. Palmer, A. Periasamy, S. Randell, T.J. Kelley, S.J. Lewis, and B. Gaston. 2016. Augmentation of CFTR maturation by S-nitrosoglutathione reductase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 310:L263-270.

Zaman, M.M., A. Gelrud, O. Junaidi, M.M. Regan, M. Warny, J.C. Shea, C. Kelly, B.P. O'Sullivan, and S.D. Freedman. 2004. Interleukin 8 secretion from monocytes of subjects heterozygous for the deltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutation is altered. *Clin Diagn Lab Immunol*. 11:819-824.

Zernecke, A., K. Bidzhekov, H. Noels, E. Shagdarsuren, L. Gan, B. Denecke, M. Hristov, T. Koppel, M.N. Jahantigh, E. Lutgens, S. Wang, E.N. Olson, A. Schober, and C. Weber. 2009. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2:ra81.

Zetsche, B., J.S. Gootenberg, O.O. Abudayyeh, I.M. Slaymaker, K.S. Makarova, P. Essletzbichler, S.E. Volz, J. Joung, J. van der Oost, A. Regev, E.V. Koonin, and F. Zhang. 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 163:759-771.

Zhang, H., F.A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof, and W. Filipowicz. 2004. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*. 118:57-68.

Zhang, K., X. Shen, J. Wu, K. Sakaki, T. Saunders, D.T. Rutkowski, S.H. Back, and R.J. Kaufman. 2006. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell*. 124:587-599.

Zhang, P.X., J. Cheng, S. Zou, A.D. D'Souza, J.L. Koff, J. Lu, P.J. Lee, D.S. Krause, M.E. Egan, and E.M. Bruscia. 2015. Pharmacological modulation of the AKT/microRNA-199a-5p/CAV1 pathway ameliorates cystic fibrosis lung hyper-inflammation. *Nature communications*. 6:6221.

Zhong, T., J.M. Perelman, V.P. Kolosov, and X.D. Zhou. 2011. MiR-146a negatively regulates neutrophil elastase-induced MUC5AC secretion from 16HBE human bronchial epithelial cells. *Mol Cell Biochem*. 358:249-255.

Zhou, H.J., L.Q. Wang, Q.S. Xu, Z.X. Fan, Y. Zhu, H. Jiang, X.J. Zheng, Y.H. Ma, and R.Y. Zhan. 2016. Downregulation of miR-199b promotes the acute spinal cord injury through IKKbeta-NF-kappaB signaling pathway activating microglial cells. *Exp Cell Res*. 349:60-67.

Zhu, G., L. Pei, F. Lin, H. Yin, X. Li, W. He, N. Liu, and X. Gou. 2019. Exosomes from human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cells protect against renal ischemia/reperfusion injury via transferring miR-199a-3p. *J Cell Physiol*.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

I. Liste des publications

Small RNA and transcriptome sequencing reveal the role of miR-199a-3p in inflammatory processes in cystic fibrosis airways
Bardin P, Duval E-M, Sonneville F, Blouquit-laye S, Rousselet N, Le Rouzic P, Corvol H, Tabary O
Journal of Pathology, june 2018, 245 :410-420

Mucoviscidose : dans la ligne des miR
Bardin P, Sonneville S, Tabary O
Médecine/Sciences juin-juillet 2018, 34, 554-562

Emerging microRNA therapeutic approaches for cystic fibrosis
Bardin P, Sonneville S, Corvol H, Tabary O
Frontiers in pharmacology, october 2018, 9, 1113

MiR-636, a newly-identified actor for the regulation of pulmonary inflammation in cystic fibrosis
Bardin P, Foussignière T, Rousselet N, Porter J, Corvol H, Tabary O
Soumis à Frontiers in immunology (August 2019)

II. Listes des communications dans le cadre de congrès

1. Orales

- 16th ECFS Basic Science Conference, 27-30 Mars 2019, Dubrovnik (Croatie)
- 20ème édition du Colloque français des jeunes chercheurs en Mucoviscidose, 26 Février 2019, Institut Pasteur, Paris (France)
- 32nd annual North American Cystic Fibrosis Conference, 18-20 Octobre 2018, Colorado Convention Center, Denver (USA)
- 12th Cystic Fibrosis European Young Investigators' Meeting (EYIM), 21-23 Février 2018, Institut Pasteur, Paris (France)
- 13ème séminaire annuel du Centre de Recherche Saint-Antoine, 16-17 Novembre 2017, Montvillargenne (France)
- 14th ECFS Basic Science Conference, 29 Mars - 1 Avril 2017, Albufeira (Portugal)
- 18ème édition du Colloque français des jeunes chercheurs en Mucoviscidose, 14 Février 2017, Institut Pasteur, Paris (France)

2. Affichées

- 20th Doctoral School Days, 20-21 Mai 2019, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris (France)
- 16th ECFS Basic Science Conference, 27-30 Mars 2019, Dubrovnik (Croatie)
- 32nd annual North American Cystic Fibrosis Conference, 18-20 Octobre 2018, Colorado Convention Center, Denver (USA)
- 19th Doctoral School Days, 22-23 Mai 2018, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris (France)
- 12th Cystic Fibrosis European Young Investigators' Meeting (EYIM), 21-23 Février 2018, Institut Pasteur, Paris (France)
- 19ème édition du Colloque français des jeunes chercheurs en Mucoviscidose, 20 février 2018, Institut Pasteur, Paris (France)
- 14th ECFS Basic Science Conference, 29 Mars - 1 Avril 2017, Albufeira (Portugal)
- 12ème séminaire annuel du Centre de Recherche Saint-Antoine, 17-18 Novembre 2016, Montvillargenne (France)

III. Liste des congrès organisés

- 14ème séminaire annuel du Centre de Recherche Saint-Antoine, 15-16 Novembre 2018, Montvillargenne (France)
- 18th Doctoral School Days, Centre de Recherche des Cordeliers, 27-28 Avril 2017, Paris (France)

IV. *Travel Grant*

- 16th ECFS Basic Science Conference, 27-30 Mars 2019, Dubrovnik (Croatie)
- 14th ECFS Basic Science Conference, 29 Mars - 1 Avril 2017, Albufeira (Portugal)

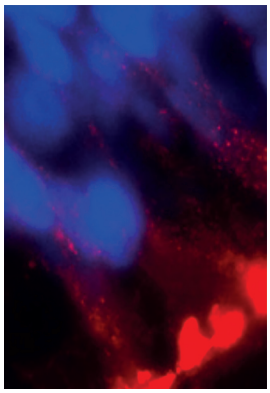
ANNEXES

médecine/sciences 2018 ; 34 : 554-62

Mucoviscidose : dans la ligne des miR

Pauline Bardin, Florence Sonneville, Olivier Tabary

> La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques dans les populations d'origine caucasienne, caractérisée par des mutations du gène codant le canal chlorure CFTR. Bien que ce gène soit connu depuis 1989, les solutions thérapeutiques curatives proposées aux patients restent limitées. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont explorées, comme celles ciblant les microARN qui participent à la régulation de l'expression d'ARN messagers cibles. Cette revue fait le point sur les travaux portant sur l'implication de ces microARN dans la mucoviscidose, notamment dans le contrôle des canaux ioniques, de l'inflammation, de l'infection et de l'obstruction bronchique, et leurs potentiels thérapeutiques. <



Sorbonne Université, UMR-S938, Centre de recherche Saint-Antoine (CRSA), Hôpital Saint-Antoine, 34, rue Crozatier, 75012 Paris, France.
olivier.tabary@inserm.fr

La mucoviscidose (ou *cystic fibrosis* en anglais) est la plus fréquente des maladies génétiques héréditaires rares dans les populations d'origine caucasienne. Depuis l'identification du gène responsable de la maladie, en 1989, de nombreuses découvertes ont permis une amélioration de la longévité et de la qualité de vie des patients. Il n'en reste pas moins qu'il s'agit d'une maladie complexe, et que de nombreuses avancées sont encore nécessaires pour comprendre les mécanismes de la pathologie et surtout guérir les patients.

La mucoviscidose touche un peu plus de 6 000 patients en France, et environ 70 000 dans le monde (à l'état homozygote ou hétérozygote composite). Cette pathologie est induite par la mutation récessive du gène qui code un canal chlorure appelé CFTR pour *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* [1]. Même si la découverte du gène responsable est récente, cette pathologie est connue depuis longtemps, et des évidences indirectes suggèrent que cette mutation était présente en Bretagne il y a plus de 3 000 ans [2]. Les premiers écrits faisant état de la maladie remontent au Moyen-Âge, rapportant les témoignages d'enfants ensorcelés et aux baisers salés [3]. Il faudra cependant attendre 1936 pour que le pédiatre suisse Guido Fanconi (1892-1979) réalise la première description de la maladie, qui sera confirmée par la pédiatre américaine Dorothy Hansine Andersen (1901-1963), deux ans plus tard.

Le gène *CFTR* est situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31). La protéine qu'il code (la protéine CFTR) est constituée de 1 480 acides aminés et appartient à la famille des transporteurs ABC (transporteurs à *ATP-binding cassette*) dont le rôle principal est le transport actif de différents substrats, comme les acides aminés, les peptides, les protéines et les ions, au travers de la membrane plasmique. Cette protéine CFTR, comme les autres protéines de la famille ABC, est constituée de deux domaines transmembranaires, de deux domaines cytosoliques de liaison à l'ATP (*NBD* pour *nucleotide-binding domains*) et d'un domaine régulateur. Elle participe directement à la régulation du transport des ions chlorures au niveau de la membrane cellulaire *(Figure 1)*, mais également à celle du transport des ions bicarbonates, qui interviennent dans la régulation du pH du liquide de surface des voies aériennes qui recouvre l'épithélium pulmonaire [4]. À ce jour, plus de 2 000 mutations du gène *CFTR* ont été identifiées, la plus fréquente (rencontrée chez près de 70 % des malades) étant la mutation F508del de la protéine (délétion d'une phénylalanine en position 508)[1]. Le nombre élevé de ces mutations et leurs conséquences sur la fonctionnalité de la protéine rendent les approches thérapeutiques complexes.

D'un point de vue physiopathologique, les mutations entraînent des altérations au niveau des tissus ou organes intégrant des glandes exocrines, comme la peau, le pancréas, les poumons, les intestins et les appareils reproducteurs. Actuellement, la principale cause de morbidité et de mortalité est liée aux atteintes pulmonaires. Elles se caractérisent par une accumulation d'un mucus épais et visqueux,

Vignette (Photo © Inserm - Pascal Trouvé).

[1] www.genet.sickkids.on.ca/cftr

m/s n° 6-7, vol. 34, juin-juillet 2018
https://doi.org/10.1051/medsci/20183406015

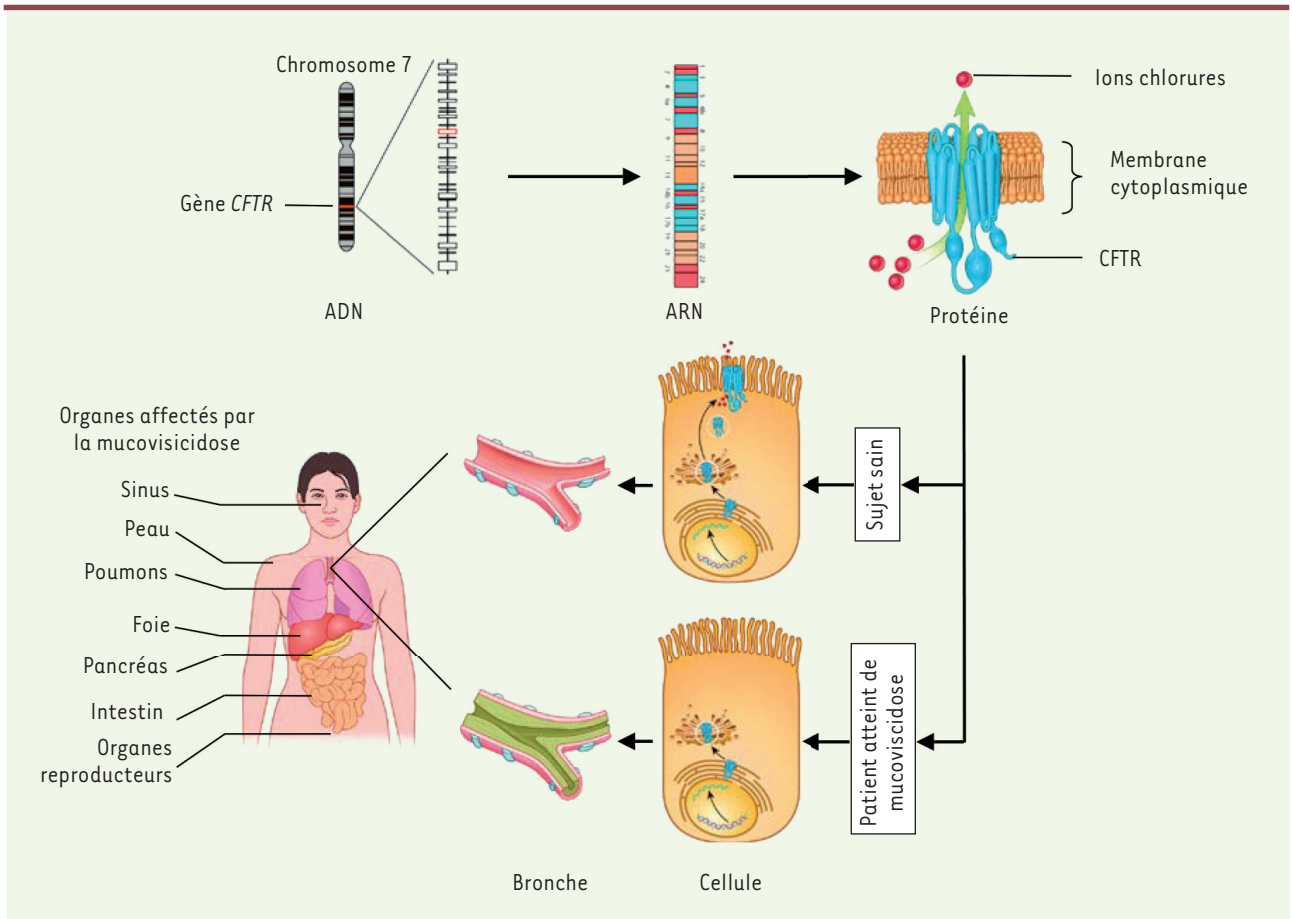


Figure 1. ***La protéine CFTR, du gène à son expression tissulaire.*** Chez l'homme le gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) est situé sur le chromosome 7 (7q31.2) avec une taille de 250 kb (kilobases) et est constitué de 27 exons. ***1.*** Après traduction, l'ARNm est constitué de 6 500 paires de bases et sera traduit en une protéine dont l'expression normale est située au niveau apical des cellules épithéliales. La protéine CFTR est un canal dont le rôle principal est le passage des ions chlorures. Dans les cellules pulmonaires normales, ce canal participe activement à l'hydratation du liquide de surface des voies aériennes et à la clairance du mucus. ***2.*** Dans les cellules de patients atteints de mucoviscidose, la mauvaise localisation et/ou la diminution de l'activité de ce canal va participer à l'épaississement du mucus qui va stagner permettant aux bactéries de proliférer. Les patients ont des atteintes pancréatiques, intestinales, hépatiques, au niveau des appareils reproducteurs et de la peau, mais la première cause de mortalité est due à des problèmes pulmonaires.

des infections récurrentes et une inflammation chronique, à l'origine d'une altération de la clairance mucociliaire. L'inflammation pourrait apparaître avant toute infection ; l'infection secondaire ne ferait qu'exacerber l'inflammation devenue incontrôlable. L'inflammation chronique se caractérise par une activation anormale de la voie de signalisation impliquant NF-κB (*nuclear factor-kappa B*), ce qui aboutit à une augmentation de sécrétion d'IL(interleukine)-8 (ou CXCL8 [*C-X-C motif chemokine 8*]), une chimiokine clé impliquée dans le recrutement des neutrophiles au niveau pulmonaire [5]. À long terme, ces différents symptômes conduisent à la dégradation de l'épithélium pulmonaire avec, pour conséquence, l'activation de mécanismes de réparation, à l'origine de l'apparition de zones de remaniements épithéliaux. Parallèlement à la desquamation et au remodelage de l'épithélium, une fibrose sous-épithéliale se développe, aboutissant à une altération de la fonction respiratoire.

Aucun traitement curatif n'existe pour lutter contre la mucoviscidose, et l'augmentation de l'espérance de vie, que l'on observe depuis ces dernières années, est en fait principalement due à une meilleure prise en charge de la maladie par des traitements asymptomatiques (kinésithérapie, mucolytiques, anti-inflammatoires et antibiotiques). De nouvelles approches thérapeutiques pharmacologiques (*Vertex Pharmaceuticals*) sont proposées aux patients depuis moins d'une dizaine d'années. Elles permettent de restaurer la protéine défectueuse à la membrane des cellules (correcteurs) et/ou de potentialiser son activité (potentiateurs). En raison de l'hétérogénéité des mutations qui touchent le gène *CFTR* selon les patients, ces traitements ne sont pas applicables à tous. Ils présentent ainsi un bénéfice

très variable, pour un coût important. Ces classes de médicaments font cependant référence dans le domaine, et de nouvelles molécules fondées sur la même stratégie sont encore en cours de développement. D'autres stratégies sont cependant proposées en parallèle. Elles permettent d'améliorer la clairance mucociliaire, de diminuer l'inflammation ou de combattre l'infection[2]. L'une des stratégies thérapeutiques originales proposées dans la littérature repose sur la stimulation d'une voie alternative à celle impliquant CFTR pour le transfert des ions chlorures, comme celle induite par le canal chlorure ANO1 (*Anoctamin-1*, encore appelé TMEM16A [*transmembrane protein 16A*]), qui participerait également à l'activation de CFTR à la membrane de la cellule [6].

miARN et mucoviscidose

Les microARN (miARN) sont définis comme de petits ARN endogènes de 21-23 nucléotides, non codants et capables de réprimer l'expression de leurs gènes cibles [51] (➜).

(➜) Voir la Synthèse de L. Fressigné *et al.*, *m/s* n° 2, février 2018, page 137

Ils participent à la régulation de nombreux processus cellulaires, et l'altération de leur expression peut être associée à certaines pathologies [7]. Les miARN sont issus de la transcription et de la maturation d'ARN messagers (ARNm) spécifiques, aboutissant à la libération *in fine* de miARN matures qui seront incorporés au sein d'un complexe ribonucléoprotéique appelé miRISC (*miRNA-induced silencing complex*). Classiquement, la régulation exercée par les miARN sur leurs gènes cibles est spécifique, par l'appariement du miARN mature à la séquence 3'-UTR de l'ARNm cible, appelé *miRNA response element* (MRE). L'activité des miARN dépend d'une séquence longue de seulement 6 nucléotides (la séquence « *seed* »). Un motif MRE peut donc être retrouvé sur différents ARNm, et un ARNm peut contenir une répétition du même motif MRE ou d'autres motifs. Les miARN jouent ainsi un rôle prépondérant au sein de réseaux complexes de régulation de l'expression de multiples gènes [8]. Chez l'homme, plus de 28 000 miARN sont référencés dans la base de données miRBase [9].

Dans le cadre d'une approche thérapeutique, il est primordial de prendre en compte l'émergence d'isomiR, des variants de séquences en 3' et 5' des miARN canoniques, mais également des mauvaises annotations que l'on peut retrouver dans la base de données. Les données recueillies par séquençage nécessitent également d'être systématiquement vérifiées, comme l'ont décrit Mercey *et al.*, pour les isomiR-34/449, impliqués dans la ciliogénèse [10]. Aujourd'hui, on estime que plus de 60 % des gènes codant une protéine sont régulés par les miARN [11]. La modulation de l'activité d'un seul miARN à la suite de l'inhibition de sa fonction ou de sa surexpression, peut ainsi avoir un impact biologique important.

De nombreuses études se sont intéressées aux miARN potentiellement régulateurs de l'expression de *CFTR* dans la mucoviscidose. Gillen *et al.* ont été les premiers à identifier des miARN en lien avec l'activité de CFTR, dont plusieurs régulaient directement son expression en se fixant à l'extrémité 3'-UTR de son ARNm. La régulation de l'expression de *CFTR* diffère en fonction du type cellulaire étudié : elle est en effet tissu-spécifique et dépend du temps, ce qui rend complexe le développement des thérapies ciblant les miARN afin de restaurer la fonction de CFTR *(Tableau I)*. Ainsi, Viart *et al.* ont montré que la régulation de *CFTR* était différente avant et après la naissance, confirmant de précédents résultats [12]. En effet, le miR-101 régule négativement l'expression de *CFTR* dans des lignées cellulaires pulmonaires adultes, mais il n'a aucun effet sur des cellules épithéliales bronchiques fœtales. Ce miARN semble ainsi jouer un rôle primordial, qui évolue au cours du temps [13]. Le lien direct existant entre miARN et *CFTR* a, par la suite, été confirmé par d'autres équipes qui ont montré que les miR-145, miR-223 et miR-494, seuls ou de manière synergique, régulent directement l'expression de *CFTR*. C'est également le cas pour le miR-509-3p et le miR-494, qui induisent une plus forte répression de son expression [14, 15]. En plus de pouvoir interagir directement avec *CFTR*, certains miARN peuvent également agir sur des acteurs intermédiaires de sa biosynthèse, comme le facteur de transcription *SIN3A* (*SIN3 transcription regulator family member A*), réprimé par le miR-138 [16]. Les miARN peuvent également réguler l'expression d'autres canaux dont l'activité est modulée par CFTR, comme le co-transporteur NKCC1 (*Na^+-K^+-$2Cl^-$-cotransport protein*) [17] ou le canal sodique ENaC (*epithelial sodium channel*) [18]. Récemment, Sonneville *et al.* ont montré qu'une augmentation de l'expression de miR-9 était à l'origine d'une diminution de celle du canal chlorure ANO1, qui est activé par le calcium et contribue à moduler l'hydratation du mucus [19].

Ces dernières années, des études montrant l'implication des miARN dans la régulation d'autres cibles participant à des aspects différents de la pathologie, comme l'inflammation, l'obstruction bronchique ou l'infection, ont ouvert de nouvelles voies d'investigation. Les miARN sont en effet capables de moduler l'expression de gènes qui participent à l'obstruction bronchique et la production de mucus, comme *MUC5AC*, qui code l'une des principales mucines pulmonaires [20]. L'expression de miR-101 au niveau des voies aériennes est ainsi augmentée dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose, avec une obstruction bronchique caractérisée par de faibles niveaux d'expression de *CFTR* [21]. L'expression des miARN est également influencée par des facteurs extérieurs, comme des bactéries pathogènes, telles que *Haemophilus influenza, Staphylococcus aureus* ou *Pseudomodas aeruginosa* [14, 15]. En contexte infectieux (par exemple en présence de *P. aeruginosa*), l'expression de miR-93, qui est

[2] https://www.cff.org/Trials/Pipeline

Année	miARN	Cibles		Modèles	Référence
		Directe	Indirecte		
2010	miR-126	TOM1		Brossages bronchiques, 16HBE14o-, CFBE41o-, HEK293	[43]
2011	miR-155	SHIP1	IL-8	IB3-1,S9	[25]
	miR-494, miR-384, miR-376b, miR-1246, miR-145, miR-331-3p et miR-939	CFTR		Caco-2	
	miR-600, miR-494, miR-384, miR-1290, miR-1246, miR-145, miR-1827, miR-331-3p et miR-939	CFTR		PANC-1	[17]
	miR-600, miR-494, miR-607 et miR-384	CFTR		16HBE14o-	
	miR-101, miR-1246, miR-494 et miR-384	SLC12A2		PANC-1	
	miR-449	Notch1		Cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide	[26]
	miR-146a	MU5AC		16HBE14o-	[20]
	miR-101, miR-494	CFTR		HEK293	[44]
2012	miR-138	SIN3A	CFTR	Cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide, Calu-3, HEK293, HeLa	[16]
	miR-101, miR-144	CFTR		16HBE14o-	[21]
2013	miR-145, miR-223, miR-494	CFTR		Brossages bronchiques, 16HBE14o-, CFBE41o-, HEK293	[14]
	miR-145	SMAD3		Epithélium nasal de patients, HEK293	[45]
	miR-509-3p, miR-494	CFTR		Cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide, Calu-3	[15]
2014	miR-31	IRF1	Cathepsine 5	Cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide, 16HBE14o-, CFBE41o-	[30]
	miR-93	IL-8		IB3, CuFi-1, NuLi-1	[22]
2015	miR-145, miR-384, miR-101, miR-600			A549	
	miR-505, miR-943, miR-377, miR-384, miR-101, miR-600	CFTR		Beas-2B	[13]
	miR-600			HBEpiC	
	miR-17	IL-8		Brossages bronchiques, 16HBE14o-, CFBE41o-, HEK293	[24]
	miR-221	ATF6			
	miR-199a-5p	CAV1		Macrophages alvéolaires de souris et humains	[31]

2016	groupe miR-17-92	CFTR	Macrophages humains	[46]
	miR-155	RPTOR	IB3, S9	[47]
	miR-199a-5p	CCN2	Cellules hépatiques stellaires	[48]
	miR-1343	récepteur TGF-β	A549, 16HBE14o-, Caco-2	[28]
2017	miR-183	SCNN1α,β,γ	CFBE41o-	[18]
	miR-145-5p	CFTR	Calu-3	[29]
	miR-145	TGF-β	Cellules primaires humaines CF et non CF	[49]
	miR-200b	CFTR	Calu-3, 16HBE14o-	[50]
	miR-9	ANO1	16HBE14o-, CFBE41o-	[19]

Tableau I. Tableau représentant les miARN dérégulés et leurs cibles directes/indirectes dans le contexte de la mucoviscidose. TOM1 : *target of Myb1 membrane trafficking protein* ; TGF-β : *transforming growth factor-beta* ; SHIP1 : *SH2 (Src homology 2)-containing inositol phosphatase-1* ; CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* ; SLCA2 : *solute carrier family 12 member 2* ; NOTCH1 : *neurogenic locus notch homolog protein 1* ; MUC5AC : mucine 5AC ; SMAD3 : *mothers against decapentaplegic homolog 3* ; IRF1 : *interferon regulatory factor 1* ; IL-8 : interleukine 8 ; ATF6 : *activating transcription factor 6* ; CAV1 : Caveoline 1 ; SCNN1 *sodium channel epithelial 1 alpha subunit* ; RPTOR : *regulatory-associated protein of MTOR complex 1* ; TbRII : *receptor protein serine/threonine kinase*) ; ANO1 : Anoctamine-1.

diminuée, est associée à une stabilisation de l'ARNm de l'IL-8, contribuant ainsi au maintien de l'état inflammatoire [22].

Au niveau des voies aériennes, les processus inflammatoires contrôlés par NF-κB sont également régulés en partie par les miARN. Ainsi, les miR-509-3p, miR-494 et miR-126 ciblent directement NF-κB [15, 23], et les miR-93 et miR-17 régulent la production d'IL-8 dans des cellules épithéliales bronchiques [22, 24]. L'expression et la fonction de CFTR diminuent également lorsque NF-κB est fonctionnel [15]. Bhattacharyva *et al.* ont ainsi montré que l'expression du miR-155 était associée à l'activité de CFTR. Ce miARN peut réguler directement SHIP1 (*SH-2 containing inositol 5' polyphosphatase 1*) et altérer indirectement la production d'IL-8 *via* l'activation de la voie de signalisation impliquant PI3K/Akt (*phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B*) et l'inhibition de celle des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) [25]. Certains miARN peuvent participer au remodelage de l'épithélium pulmonaire et avoir un rôle majeur dans le développement de la physiopathologie de la maladie. L'expression de miR-449 dans l'épithélium respiratoire est indispensable pour induire une inhibition directe de la voie Notch et une modulation de celle impliquant les petites GTPases, deux événements nécessaires pour la fabrication des cils motiles, dont le battement permet l'évacuation du mucus [26, 27]. Le remodelage de l'épithélium pulmonaire peut également être provoqué par des dérégulations de la voie du TGF-β (*transforming growth factor-beta*), tant au niveau de l'expression de ses récepteurs (TGF-βR1 et R2), que d'intermédiaires de signalisation comme RPTOR (*regulatory-associated protein of mTOR complex 1*) ou des protéines SMAD, respectivement *via* les miR-1343, miR-155 et miR-145 affectant ainsi les marqueurs fibrotiques, la migration cellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse [28, 29]. La dérégulation du miR-31 dans les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose contribue à l'inflammation pulmonaire en augmentant l'activité de la cathepsine 5 qui dégrade les protéines antimicrobiennes [30]. Le miR-221 contrôle, quant à lui, le facteur de transcription *ATF6* (*activating transcription factor 6*) qui est impliqué dans l'inflammation engendrée par le stress du réticulum endoplasmique [24]. Le miR-199a-5p régule la cavéoline 1 (CAV1), une protéine impliquée dans les processus de résolution de l'inflammation, en ciblant l'axe PI3K/Akt/CAV1 [31] et la voie du TGF-β [32]. À noter que le Celecoxib, qui module l'axe Akt/miR-199a-5p/CAV1, améliore chez les patients l'hyper-inflammation pulmonaire due aux macrophages.

Les miARN : stratégie thérapeutique

Les miARN sont aujourd'hui considérés comme des cibles thérapeutiques potentielles *(Figure 2)*. Deux d'approches ont été suivies pour le développement de thérapies fondées sur leur utilisation : les antagonistes (inhibiteurs, *target site blocker* [TSB] et éponges à miR) et les *mimics* de miARN.

Les *mimics* de miARN sont des ARN mimant les molécules endogènes et permettant d'amplifier leur fonction. Ils sont utilisés pour restaurer une perte de fonction. Cette approche dite « thérapie de remplacement de miARN » vise à réintroduire des miARN dont l'expression est diminuée dans un contexte pathologique. La preuve de concept de cette thérapie de remplacement de miARN a été démontrée avec l'utilisation de miARN suppresseurs de tumeur, qui stimulent des voies de signalisation anti-oncogéniques et qui conduisent à l'éradication de cellules tumorales [33]. Des *mimics* de

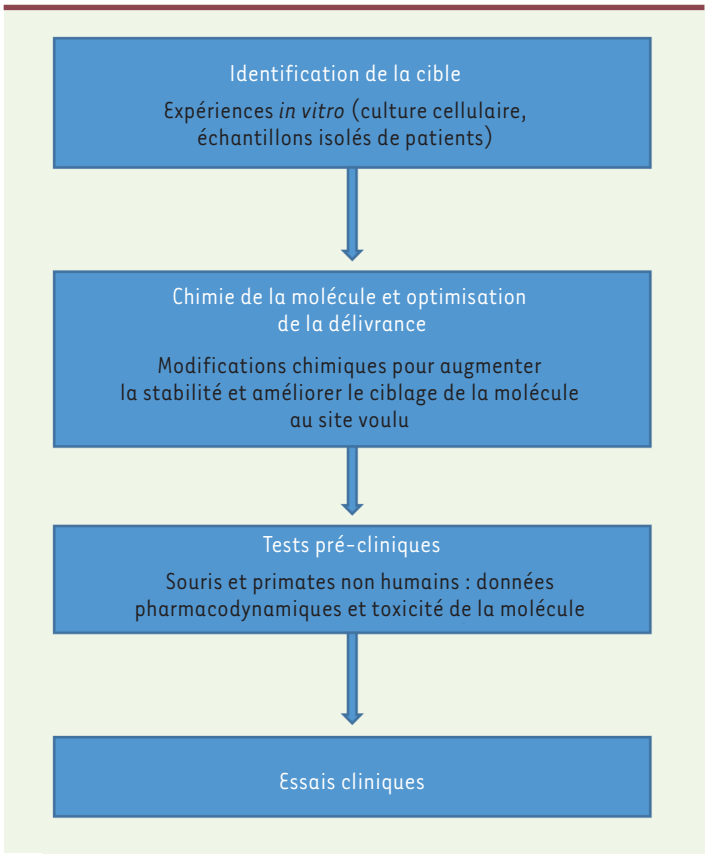


Figure 2. ***Graphique représentant les étapes du développement d'une molécule ciblant les miARN vers la clinique.*** La première étape dans le développement d'une molécule vers la clinique consiste à identifier un miARN candidat et sa cible, et à valider ce couple dans différents modèles *in vitro* et *in vivo*. L'étape suivante implique le développement de modifications chimiques et systèmes de délivrance pour augmenter la stabilité de la molécule et l'amener au site voulu. Des tests pré-cliniques doivent ensuite être effectués afin d'évaluer la toxicité de la molécule et ses données pharmacodynamiques avant qu'elle ne puisse rentrer en phase d'essais cliniques.

let-7 et miR-34 sont ainsi actuellement en phase de développement clinique pour cibler un large spectre de tumeurs. La première molécule ayant pour but d'augmenter l'expression du miR-34 par l'utilisation d'un *mimic* (MRX34), est entrée en essais cliniques de phase I en 2013, dans le cadre d'études concernant des tumeurs solides multiples [34]. La principale limite de cette approche est la difficulté de formulation du *mimic* pour sa délivrance aux cellules cibles. Une des stratégies existantes pour y remédier est leur couplage à des nanoparticules. Dans l'essai clinique utilisant le MRX34, le *mimic* est encapsulé dans un système de délivrance formé de liposomes afin de faciliter son absorption par les cellules cibles [34]. Une approche alternative utilise une délivrance par des vecteurs d'expression de miARN.

Les antagonistes de miARN, quant à eux, sont utilisés pour inhiber des miARN endogènes qui présentent un gain de fonction dans un contexte pathologique. Ces thérapies sont similaires à l'utilisation de siARN (petits ARN interférents ou *small interfering RNA*), même si les systèmes de régulation impliqués sont différents. L'antagoniste de miARN, ou antagomiR (également nommé antimiR), se lie avec une très forte affinité au miARN mature qu'il cible. Le duplex ainsi formé sera ensuite dégradé. L'inconvénient majeur de ce type de thérapie provient de ce qu'un miARN peut réguler l'expression de plusieurs gènes. L'inhibition d'un miARN, non spécifique d'un gène particulier, peut ainsi résulter en de nombreux effets secondaires.

Les récents développements réalisés sur les miARN ont permis d'accélérer l'évolution de méthodes et de modifications chimiques qui permettent d'inhiber les miARN de façon stable et d'optimiser leur délivrance. Il s'agit des *locked nucleic acids* (LNA, ou acides nucléiques bloqués), des *peptide nucleic acids* (PNA), des groupements phosphorothioates[3], des éponges à miARN (*miRNA sponges)* et des nanoparticules *(Figures 3)* [23, 35].

La base constituant le LNA est un analogue d'acide nucléique dans lequel l'anneau de ribose est modifié chimiquement par l'introduction d'un pont méthylène. Cette modification chimique permet d'apporter à la molécule une grande stabilité thermodynamique et empêche sa dégradation par les nucléases en renforçant son affinité pour sa cible [36].

Les éponges à miARN sont des constructions, ou des ARN, qui présentent plusieurs sites de fixation pour un miARN d'intérêt, ce qui permet de limiter sa disponibilité et donc son action sur les cibles associées. Dans le mélanome, l'ARN de TYRP1 (*tyrosinase-related protein 1*) agit comme une éponge qui, en s'associant au miR-16, limite son activité suppresseur de tumeur. L'inhibition des cibles par un bloqueur de fixation permet à miR-16 d'agir sur sa cible RAB17 et empêche la prolifération cellulaire [37]. Ce type d'approche utilisant les propriétés des éponges à miARN et les LNA pourrait être envisagé dans un but thérapeutique.

Le premier antagomiR développé pour des études cliniques, le miravirsen (SPC3649), est un antimiR-122, qui cible et séquestre le miR-122 spécifique du foie. Le miR-122 se lie au 5'UTR de l'ARNm du virus de l'hépatite C (HCV) qu'il stabilise, conduisant à l'accumulation du virus. Le miravirsen présente l'avantage d'être couplé à une base LNA (le rendant résistant aux nucléases) et de comporter des liaisons phosphorothioates. Il a été initialement testé chez la souris et les singes verts africains [38]. Son action a ensuite été examinée chez des chimpanzés infectés de manière chronique par le HCV,

[3] Les oligonucléotides phosphorothioates présentent une grande résistance aux nucléases et sont très stables.

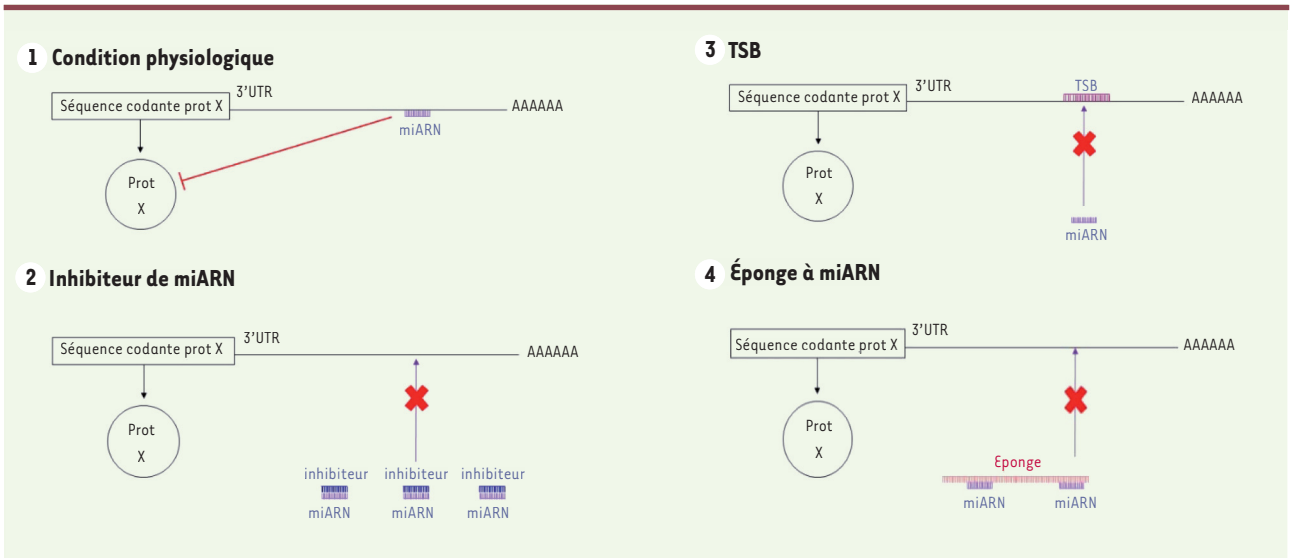


Figure 3. ***Schémas représentant les différentes approches pour inhiber un miARN. 1. Condition physiologique :*** le miARN va se fixer au 3'UTR de sa cible et entraîner une inhibition de sa traduction ou une dégradation de son ARNm. ***2. Inhibiteur de miARN :*** l'inhibiteur de miARN se fixe à ce dernier par complémentarité et empêche son action sur sa cible. ***3. TSB :*** le TSB (*target site blocker*) se fixant spécifiquement sur le 3'UTR de l'ARNm cible au site de fixation du miARN, le miARN ne peut donc plus s'y fixer et exercer son action. ***4. Éponge à miARN :*** le miARN étant saturé par l'éponge à miARN qui contient de nombreuses séquences complémentaires au miARN, le miARN ne peut alors plus se fixer sur sa cible.

et une diminution prolongée de la réplication du virus, sans preuve de résistance virale ou d'effets secondaires, a été observée chez les animaux traités. En 2011-2012, une étude de phase IIa a été réalisée chez des patients atteints d'hépatite C chronique qui ont reçu cinq injections par voie sous-cutanée par semaine de miravirsen pendant une période de 29 jours. Cette étude clinique a montré une diminution prolongée, dépendant de la dose, des niveaux d'ARN viraux et de la cholestérolémie, et une modification de l'expression d'une centaine de gènes dans le foie. Les niveaux d'ARN viraux sont devenus indétectables chez cinq patients, avec cependant un rebond de l'expression du virus chez certains [39]. La variabilité de réponses observée chez les patients suggère cependant que des facteurs viraux et/ou de l'hôte influencent la réponse au traitement par le miravirsen. Récemment, un changement de nucléotide C3U en 5'UTR de l'ARNm de l'HCV a été mis en évidence chez les patients qui présentaient un rebond de réplication virale [40]. Ce mutant C3U est insensible au miravirsen. Il rendrait donc le virus indépendant du miR-122 ; le virus utiliserait alors un mécanisme alternatif pour se stabiliser et se répliquer. La diminution plasmatique du miR-122 chez les patients est toujours observée deux mois après la dernière injection de miravirsen, sans doute en raison de la longue demi-vie du miravirsen dans les tissus (environ 30 jours) [41]. Deux compagnies pharmaceutiques (*Roche* et *Regulus Therapeutics*) sont actuellement impliquées dans des essais cliniques visant à traiter l'infection par le virus de l'hépatite C en utilisant des antimiR-122 *(Tableau II)*.

En ce qui concerne la mucoviscidose, une équipe française a utilisé des TSB qui, en se liant au 3'UTR de l'ARNm de CFTR, empêche la fixation des miR-101 et miR-145. La transfection de ces molécules dans des cellules épithéliales bronchiques de patients atteints de mucoviscidose conduit à une augmentation de l'expression et de l'activité de CFTR, suggérant que ces TSB pourraient être utilisées en thérapeutique [13]. D'autres cibles sont envisagées, comme la protéine ANO1 impliquée, comme CFTR, dans la sécrétion d'ions chlorures, la régulation du pH et la fluidité du liquide de surface des voies aériennes [4, 42]. Les travaux de Sonneville *et al.* ont montré qu'un TSB empêchant spécifiquement la fixation d'un miARN (miR-9) sur le 3'-UTR de l'ARNm du canal chlorure alternatif ANO1 permettait, dans des modèles *in vitro* et *in vivo,* d'augmenter son expression, son activité chlorure et la migration cellulaire, mais également la clairance mucociliaire. La restauration de ces paramètres, dérégulés à un niveau physiologique, permet de proposer aujourd'hui le TSB ANO1 comme une cible thérapeutique potentielle dans le contexte de la mucoviscidose [19]. Chaque patient serait susceptible de pouvoir bénéficier de ce type d'approche conduisant à l'activation d'une sécrétion chlorure indépendante de CFTR. Dans l'étude de Sonneville *et al.,* le TSB ANO1 a été administré par instillation intranasale aux animaux. Si cette molécule devait être utilisée chez l'homme, son mode d'administration nécessitera d'être déterminé. L'inhalation semble en effet la méthode la plus adaptée, l'atteinte pulmonaire étant prédominante chez les patients. Tissu-spécifique, elle présente une exposition systémique moindre, diminuant ainsi le risque d'effets secondaires. Cependant, les poumons des patients présentent des barrières, comme l'obstruction des

Nom de la molécule	Nom de la compagnie pharmaceutique	Type de molécule/ miARN cible	Maladie cible
Miravirsen	Santaris pharma puis Roche	antimiR-122	Hépatite C
RG-101	Regulus Therapeutics	antimiR-122	Hépatite C
RG-125/AZD4076	Regulus Therapeutics	antimiR-103/107	Diabète de type 2
MRG-106	miRagen Therapeutics	antimiR-155	Lymphome cutané à cellules T
MRG-201	miRagen Therapeutics	*mimic* miR-29	Sclérodermie
MesomiR-1	EnGeneIC	*mimic* miR-16	Mésothéliome
MRX34	miRNA therapeutics	*mimic* miR-34	Tumeurs solides multiples

Tableau II. ***Molécules ciblant des miARN actuellement en cours d'essais cliniques.***

voies aériennes par le mucus, pouvant rendre l'administration difficile. Le passage du TSB à travers le mucus reste donc à étudier. ◊

SUMMARY

miRNA as a bullet against cystic fibrosis

Cystic fibrosis is the most common lethal genetic disease in the Caucasian population, characterized by *CFTR* gene mutations, which is a chloride channel. Whereas this gene has been known since 1989, the curative therapeutic solutions proposed to patients remain limited. New therapeutic strategies are therefore being explored, such as those targeting miRNA participating in the regulation of target mRNA expression. This review focuses on the involvement of miRNA in cystic fibrosis including ion channel control, inflammation, infection and bronchial obstruction and their therapeutic potential. ◊

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

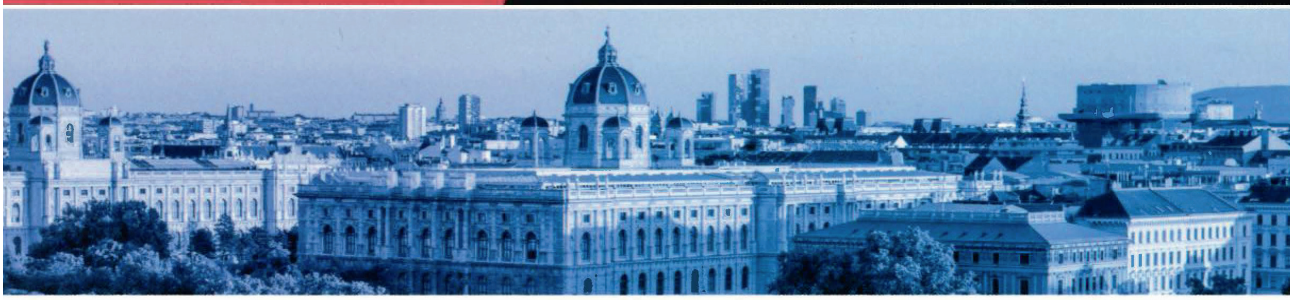
1. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989 ; 245 : 1066-73.
2. Farrel P, Le Marechal C, Ferec C, *et al.* Discovery of the principal cystic fibrosis mutation (F508del) in ancient DNA from iron age Europeans. *Nature Precedings* 2007. http://hdl.handle.net/10101/npre.2007.1276.1
3. O'Connor GT, Quinton HB, Kahn R, *et al.* Case-mix adjustment for evaluation of mortality in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2002 ; 33 : 99-105.
4. Jun I, Cheng MH, Sim E, *et al.* Pore dilatation increases the bicarbonate permeability of CFTR, ANO1 and glycine receptor anion channels. *J Physiol* 2016 ; 594 : 2929-55.
5. Tabary O, Zahm JM, Hinnrasky J, *et al.* Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 1998 ; 153 : 921-30.
6. Benedetto R, Ousingsawat J, Wanitchakool P, *et al.* Epithelial chloride transport by CFTR requires TMEM16A. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 12397.
7. Foster PS, Plank M, Collison A, *et al.* The emerging role of microRNAs in regulating immune and inflammatory responses in the lung. *Immunol Rev* 2013 ; 253 : 198-215.
8. Sonneville F, Ruffin M, Guillot L, *et al.* New insights about miRNAs in cystic fibrosis. *Am J Pathol* 2015 ; 185 : 897-908.
9. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014 ; 42 : D68-73.
10. Mercey O, Popa A, Cavard A, *et al.* Characterizing isomiR variants within the microRNA-34/449 family. *FEBS Lett* 2017 ; 591 : 693-705.
11. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009 ; 19 : 92-105.
12. Marcorelles P, Montier T, Gillet D, *et al.* Evolution of CFTR protein distribution in lung tissue from normal and CF human fetuses. *Pediatr Pulmonol* 2007 ; 42 : 1032-40.
13. Viart V, Bergougnoux A, Bonini J, *et al.* Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2015 ; 45 : 116-28.
14. Oglesby IK, Chotirmall SH, McElvaney NG, Greene CM. Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by microRNA-145, -223, and -494 is altered in DeltaF508 cystic fibrosis airway epithelium. *J Immunol* 2013 ; 190 : 3354-62.
15. Ramachandran S, Karp PH, Osterhaus SR, *et al.* Post-transcriptional regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and function by microRNAs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013 ; 49 : 544-51.
16. Ramachandran S, Karp PH, Jiang P, *et al.* A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and DeltaF508 mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 13362-7.
17. Gillen AE, Gosalia N, Leir SH, Harris A. MicroRNA regulation of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Biochem J* 2011 ; 438 : 25-32.
18. Kim K, Hung RJ, Perrimon N. miR-263a regulates ENaC to maintain osmotic and intestinal stem cell homeostasis in Drosophila. *Dev Cell* 2017 ; 40 : 23-36.
19. Sonneville F, Ruffin M, Coraux C, *et al.* MicroRNA-9 downregulates the ANO1 chloride channel and contributes to cystic fibrosis lung pathology. *Nat Commun* 2017 ; 8 : 710.
20. Zhong T, Perelman JM, Kolosov VP, Zhou XD. MiR-146a negatively regulates neutrophil elastase-induced MUC5AC secretion from 16HBE human bronchial epithelial cells. *Mol Cell Biochem* 2011 ; 358 : 249-55.
21. Hassan F, Nuovo GJ, Crawford M, *et al.* MiR-101 and miR-144 regulate the expression of the CFTR chloride channel in the lung. *PLoS One* 2012 ; 7 : e50837.
22. Fabbri E, Borgatti M, Montagner G, *et al.* Expression of microRNA-93 and Interleukin-8 during Pseudomonas aeruginosa-mediated induction of proinflammatory responses. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014 ; 50 : 1144-55.
23. McKiernan PJ, Cunningham O, Greene CM, Cryan SA. Targeting miRNA-based medicines to cystic fibrosis airway epithelial cells using nanotechnology. *Int J Nanomedicine* 2013 ; 8 : 3907-15.
24. Oglesby IK, Vencken SF, Agrawal R, *et al.* miR-17 overexpression in cystic fibrosis airway epithelial cells decreases interleukin-8 production. *Eur Respir J* 2015 ; 46 : 1350-60.
25. Bhattacharyya S, Balakathiresan NS, Dalgard C, *et al.* Elevated miR-155 promotes inflammation in cystic fibrosis by driving hyperexpression of interleukin-8. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 11604-15.
26. Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, *et al.* Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat Cell Biol* 2011 ; 13 : 693-9.

RÉFÉRENCES

27. Chevalier B, Adamiok A, Mercey O, *et al.* miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nat Commun* 2015 ; 6 : 8386.
28. Stolzenburg LR, Wachtel S, Dang H, Harris A. miR-1343 attenuates pathways of fibrosis by targeting the TGF-beta receptors. *Biochem J* 2016 ; 473 : 245-56.
29. Fabbri E, Tamanini A, Jakova T, *et al.* A peptide nucleic acid against microRNA miR-145-5p enhances the expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in Calu-3 cells. *Molecules* 2017 ; 23.
30. Weldon S, McNally P, McAuley DF, *et al.* miR-31 dysregulation in cystic fibrosis airways contributes to increased pulmonary cathepsin S production. *Am J Respir Crit Care Med* 2014 ; 190 : 165-74.
31. Zhang PX, Cheng J, Zou S, *et al.* Pharmacological modulation of the AKT/microRNA-199a-5p/CAV1 pathway ameliorates cystic fibrosis lung hyper-inflammation. *Nat Commun* 2015 ; 6 : 6221.
32. Lino Cardenas CL, Henaoui IS, Courcot E, *et al.* miR-199a-5p Is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation by targeting caveolin-1. *PLoS Genet* 2013 ; 9 : e1003291.
33. Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, *et al.* Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res* 2010 ; 70 : 5923-30.
34. Bouchie A. First microRNA mimic enters clinic. *Nat Biotechnol* 2013 ; 31 : 577.
35. Nguyen DD, Chang S. Development of novel therapeutic agents by inhibition of oncogenic microRNAs. *Int J Mol Sci* 2017 ; 19.
36. Lindow M, Kauppinen S. Discovering the first microRNA-targeted drug. *J Cell Biol* 2012 ; 199 : 407-12.
37. Gilot D, Migault M, Bachelot L, *et al.* A non-coding function of TYRP1 mRNA promotes melanoma growth. *Nat Cell Biol* 2017 ; 19 : 1348-57.
38. Elmen J, Lindow M, Schutz S, *et al.* LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 2008 ; 452 : 896-9.
39. van der Ree MH, van der Meer AJ, de Bruijne J, *et al.* Long-term safety and efficacy of microRNA-targeted therapy in chronic hepatitis C patients. *Antiviral Res* 2014 ; 111 : 53-9.
40. Ottosen S, Parsley TB, Yang L, *et al.* In vitro antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of miravirsen, a novel anti-hepatitis C virus therapeutic targeting the human factor miR-122. *Antimicrob Agents Chemother* 2015 ; 59 : 599-608.
41. Matthes E, Goepp J, Carlile GW, *et al.* Low free drug concentration prevents inhibition of F508del CFTR functional expression by the potentiator VX-770 (ivacaftor). *Br J Pharmacol* 2016 ; 173 : 459-70.
42. Ruffin M, Voland M, Marie S, *et al.* Anoctamin 1 dysregulation alters bronchial epithelial repair in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2013 ; 1832 : 2340-51.
43. Oglesby IK, Bray IM, Chotirmall SH, *et al.* miR-126 is downregulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression. *J Immunol* 2010 ; 184 : 1702-9.
44. Megiorni F, Cialfi S, Dominici C, *et al.* Synergistic post-transcriptional regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by miR-101 and miR-494 specific binding. *PLoS One* 2011 ; 6 : e26601.
45. Megiorni F, Cialfi S, Cimino G, *et al.* Elevated levels of miR-145 correlate with SMAD3 down-regulation in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2013 ; 12 : 797-802.
46. Tazi MF, Dakhlallah DA, Caution K, *et al.* Elevated Mirc1/Mir17-92 cluster expression negatively regulates autophagy and CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) function in CF macrophages. *Autophagy* 2016 ; 12 : 2026-37.
47. Tsuchiya M, Kalurupalle S, Kumar P, *et al.* RPTOR, a novel target of miR-155, elicits a fibrotic phenotype of cystic fibrosis lung epithelium by upregulating CTGF. *RNA Biol* 2016 ; 13 : 837-47.
48. Chen L, Chen R, Velazquez VM, Brigstock DR. Fibrogenic signaling is suppressed in hepatic stellate cells through targeting of connective tissue growth factor (CCN2) by cellular or exosomal microRNA-199a-5p. *Am J Pathol* 2016 ; 186 : 2921-33.
49. Lutful Kabir F, Ambalavanan N, Liu G, *et al.* microRNA-145 antagonism reverses TGF-beta inhibition of F508del CFTR correction in airway epithelia. *Am J Respir Crit Care Med* 2018 ; 197 : 632-43.
50. Bartoszewska S, Kamysz W, Jakiela B, *et al.* miR-200b downregulates CFTR during hypoxia in human lung epithelial cells. *Cell Mol Biol Lett* 2017 ; 22 : 23.
51. Fressigné L, Simard MJ. La biogenèse des ARN courts non codants chez les animaux. *Med Sci (Paris)* 2018 ; 34 : 137-44.

TIRÉS À PART
O. Tabary

SAVE THE DATE July 6 - 10, 2018 | Vienna, Austria



ICNMD 2018
15TH INTERNATIONAL CONGRESS ON NEUROMUSCULAR DISEASES
www.icnmd2018.org

WFN
IOGNI
Ludwig Boltzmann Institute
Experimental and Clinical Traumatology

frontiers in Pharmacology

REVIEW
published: 08 October 2018
doi: 10.3389/fphar.2018.01113

Emerging microRNA Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis

*Pauline Bardin[1], Florence Sonneville[1], Harriet Corvol[1,2] and Olivier Tabary[1]**

[1] INSERM UMR-S938, Centre de Recherche Saint Antoine, Faculté des Sciences, Sorbonne Université, Paris, France,
[2] Paediatric Respiratory Department, Hôpital Trousseau, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France

Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator *(CFTR)* gene and remains the most common life-shortening diseases affecting the exocrine organs. The absence of this channel results in an imbalance of ion concentrations across the cell membrane and results in more abnormal secretion and mucus plugging in the gastrointestinal tract and in the lungs of CF patients. The direct introduction of fully functional CFTR by gene therapy has long been pursued as a therapeutical option to restore CFTR function independent of the specific CFTR mutation, but the different clinical trials failed to propose persuasive evidence of this strategy. The last ten years has led to the development of new pharmacotherapies which can activate CFTR function in a mutation-specific manner. Although approximately 2,000 different disease-associated mutations have been identified, a single codon deletion, F508del, is by far the most common and is present on at least one allele in approximately 70% of the patients in CF populations. This strategy is limited by chemistry, the knowledge on CFTR and the heterogenicity of the patients. New research efforts in CF aim to develop other therapeutical approaches to combine different strategies. Targeting RNA appears as a new and an important opportunity to modulate dysregulated biological processes. Abnormal miRNA activity has been linked to numerous diseases, and over the last decade, the critical role of miRNA in regulating biological processes has fostered interest in how miRNA binds to and interacts explicitly with the target protein. Herein, this review describes the different strategies to identify dysregulated miRNA opens up a new concept and new opportunities to correct CFTR deficiency. This review describes therapeutic applications of antisense techniques currently under investigation in CF.

Keywords: cystic fibrosis, miRNA, therapy, oligonucleotides, CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), ANO 1 channel

OPEN ACCESS

Edited by:
Nicoletta Pedemonte,
Istituto Giannina Gaslini (IRCCS), Italy

Reviewed by:
Oscar Moran,
Istituto di Biofisica (IBF), Italy
John Philip Winpenny,
University of East Anglia,
United Kingdom

***Correspondence:**
Olivier Tabary
olivier.tabary@inserm.fr

Specialty section:
This article was submitted to Pharmacology of Ion Channels and Channelopathies, a section of the journal Frontiers in Pharmacology

Received: *13 July 2018*
Accepted: *10 September 2018*
Published: *08 October 2018*

Citation:
Bardin P, Sonneville F, Corvol H and Tabary O (2018) Emerging microRNA Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. Front. Pharmacol. 9:1113. doi: 10.3389/fphar.2018.01113

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is the most common lethal genetic disease in the Caucasian population. Since the gene responsible for the disease was identified in 1989 (Riordan et al., 1989), numerous discoveries have led to an improvement in patients' longevity and quality of life. It is a complex disease, and many advances are still needed to understand the mechanisms of the pathology, to cure patients.

Cystic fibrosis affects about 70,000 people worldwide (in the homozygous or heterozygous composite state). It is induced by the recessive mutation of the gene that encodes a chloride channel called CFTR for Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (Riordan et al., 1989).

The *CFTR* gene is located on the long arm of chromosome 7 (7q31) and encoded for the CFTR protein composed of 1,480 amino acids and belongs to the family of ABC transporters (ATP-binding cassette transporters) whose central role is the active transport of various substrates, such as amino acids, peptides, proteins, and ions through the plasma membrane. The CFTR protein participates directly in the regulation of the transport of chloride ions at the cell membrane, as well as in the transport of bicarbonate ions, which are involved in the regulation of the pH of the airway surface liquid covering the pulmonary epithelium (Jun et al., 2016).

From a pathophysiological point of view, mutations cause alterations in the tissues or organs integrating the exocrine glands, such as the skin, pancreas, lungs, intestines, and reproductive systems. Currently, the leading cause of morbidity and mortality is related to damage to the lungs. They are characterized by an accumulation of thick, viscous mucus, recurrent infections, and chronic inflammation, causing an impairment of mucociliary clearance. Inflammation could appear before any infection; the secondary infection would only exacerbate the uncontrollable inflammation (Jacquot et al., 2008). In the long term, these various symptoms lead to the deterioration of the pulmonary epithelium with, as a result, repair mechanisms being activated at the root of the appearance of areas of epithelial rearrangement. Alongside the peeling and remodeling of the epithelium, subepithelial fibrosis develops, leading to impaired respiratory function.

To date, more than 2,000 mutations of the CFTR gene have been identified, the most common (found in nearly 70% of patients) being the F508del mutation of the protein (deletion of a phenylalanine at position 508). These mutations are divided into six classes according to their degree of severity in CF disease and the mechanism that disrupts CFTR function and induced a tremendous phenotypic variability of CF patients (Corvol et al., 2016). CFTR mutation classes were created according to their consequences on CFTR function mutations interfering with protein synthesis (class I), mutations affecting protein maturation (class II), mutations altering channel regulation (class III), mutations affecting chloride conductance (class IV), mutations reducing the level of normally functioning CFTR at the apical membrane (class V), and mutations decreasing the stability of CFTR present at the plasma membrane (class VI) (Fanen et al., 2014). The high number of these mutations and their effects on the functionality of the protein make an unique therapeutic approach complicated[1].

CYSTIC FIBROSIS AND THERAPEUTIC APPROACHES

At the moment, there is no cure for CF. The increase in life expectancy observed in recent years is in fact mainly due to better management of the disease with symptomatic treatments (physical therapy, mucolytic agents, anti-inflammatories, and antibiotics). New pharmacological therapeutic approaches (Vertex Pharmaceuticals) have been proposed to patients for less than a decade. They help to restore the defective protein to the cell membrane (correctors) and/or to potentiate its activity (potentiators). The first small molecule that has demonstrated efficacy is ivacaftor. Preclinical and different clinical studies have shown that ivacaftor corrects CFTR-mediated chloride transport in most class III mutations, class IV mutations, and some other residual function mutations (Bessonova et al., 2018). A subsequent series of clinical trials have shown that ivacaftor has a high level of efficacy in class III mutations, particularly in patients with G551D (Gly551Asp) mutation even in very young children (Rosenfeld et al., 2018). In all clinical studies, compared with placebo, treatment with ivacaftor improved lung function (FEV1) by around 10%, reduced sweat chloride concentration by around 60 mmol/L, improved quality of life, and reduced the frequency of pulmonary exacerbations. The second small molecule strategy has been to target patients who are homozygous for the F508del mutation with a combination of a corrector drug to restore trafficking of CFTR and a potentiator to make it functional even if the activity of the channel remained low. The different clinical trials have demonstrated an improvement of 2.8 to 3.3% in FEV1 read out, that reflect a small effect for a high cost that induces a debate in the different national institute for health (Gulland, 2016). Due to the heterogeneity of the mutations that affect the *CFTR* gene from patient to patient (Veit et al., 2016), these treatments are not applicable to everyone and therefore have a highly variable benefit, depending on the class mutation (Gulland, 2016). Unfortunately, at present, there is no treatment that would treat all patients and in particular patients with a class I mutation. These drug classes, however, are a frame of reference in the field, and new molecules based on the same strategy are still under development. However, other strategies are proposed at the same time. They improve mucociliary clearance, decrease inflammation or fight infection[2]. One of the new therapeutic strategies proposed in the literature is based on the stimulation of an alternative pathway to that involving CFTR for the transfer of chloride ions, such as that induced by the chloride channel ANO1 (Anoctamin-1, also called TMEM16A [transmembrane protein 16A]) (Caputo et al., 2008; Schroeder et al., 2008; Yang et al., 2008; Sonneville et al., 2017), which could also participate in the activation of CFTR in the cell membrane (Benedetto et al., 2017). Another proposed emerging approach is based on modulating the expression of the microRNAs that regulate target RNAs such as CFTR.

miRNAs: CFTR AND OTHER ASSOCIATED CHANNEL PROTEINS

MicroRNAs (miRNAs) are defined as small, non-coding, 21–23 nucleotide endogenous RNAs able of suppressing the expression of their target genes. miRNAs can be classified on their genomic location and gene structure, and in the miRBase database, more than 28,000 miRNAs are referenced (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014). Almost half of the known

[1]www.genet.sickkids.on.ca/cftr

[2]https://www.cff.org/Trials/Pipeline

miRNA genes are located in intergenic regions. Intronic miRNA, are located in the introns of annotated genes, including both coding and non-coding genes. Intergenic and intronic miRNAs gene may exist as a single gene or a cluster of genes under the control of their own promoters. Mixed miRNA are found overlapping across an exon and an intron of non-coding genes (Wang and Cai, 2017; **Figure 1**).

They participate in the regulation of many cellular processes, and the impairment of their expression may be associated with some pathologies (Foster et al., 2013). miRNAs are produced by transcription and maturation of their mRNA, ultimately with the release of a mature miRNA that will be incorporated into a ribonucleoprotein complex called miRISC (miRNA-induced silencing complex; **Figure 2**). Traditionally, the regulation exerted by miRNAs on their target gene is specific, through the pairing of the mature miRNA with the 3′-UTR sequence of the target mRNA, called miRNA response element (MRE) (**Figure 3**). The activity of the miRNAs depends on a long sequence of only 6 nucleotides (the "seed" sequence). An MRE motif can, therefore, be found on different mRNAs, and a mRNA can contain a repetition of the same MRE motif or other motifs. miRNAs play a dominant role in the complex multiple-gene expression regulation networks (Sonneville et al., 2015). When talking about a therapeutic approach, it is essential to take into account the emergence of isomiR, the 3′ and 5′ sequence variants of canonical miRNAs, as well as the wrong annotations that can be found in the database. The data collected by sequencing also need to be systematically verified, as described previously for isomiR-34/449, involved in ciliogenesis (Mercey et al., 2017). Today, it is estimated that more than 60% of the genes encoding a protein are regulated by miRNAs (Friedman et al., 2009). Modulating the activity of a single miRNA as a result of the inhibition of its function or overexpression can thereby have a significant biological impact.

Many studies have focused on the potentially regulatory miRNAs of *CFTR* expression in CF. Gillen et al. (2011) were the first to identify miRNAs related to CFTR activity, several of them directly regulated its expression by binding to the 3′-UTR end of its mRNA. The regulation of *CFTR* mRNA expression differs according to the cell type being studied: it is, in fact, tissue-specific, and time-dependent, which makes the development of miRNA-targeting therapies meant to restore the function of CFTR complicated (**Table 1**). Thus, Viart et al. (2015) showed that *CFTR* regulation was different before and after birth, confirming previous results CFTR channel is strongly expressed but it falls after birth at the pulmonary level (Marcorelles et al., 2007). In fact, miR-101 negatively regulates *CFTR* expression in adult lung cell lines, but it has no effect on fetal bronchial epithelial cells. It, therefore, seems to play a crucial role, which evolves over time (Viart et al., 2015). The combination of this miRNA with miR-494 makes it possible to remarkably suppress the expression of CFTR in human renal embryos. *In silico* analyzes have shown that these two miRNAs can target genes concomitantly and thus influence the severity of CF patients' pathology (Megiorni et al., 2011). The direct link between miRNA and *CFTR* has subsequently been confirmed by other teams who have shown that miR-145, miR-223, and miR-494, alone or together synergistically, directly regulate *CFTR* expression. This is also the case for miR-509-3p and miR-494, which induce stronger repression of its expression (Oglesby et al., 2013; Ramachandran et al., 2013). In addition to being able to interact directly with *CFTR*, some miRNAs can also act on intermediate actors of its biosynthesis, such as the transcription factor *SIN3A* (SIN3 transcription regulator family member A), repressed by miR-138 (Ramachandran et al., 2012; **Table 1**). They showed that the overexpression of miR-138 contributes to increase the expression and the number of CFTR channels on the cell surface of secretory epithelia but also the activity of the channel, in healthy subjects and CF patient with F508del mutations even if the mutated channel is less active than the wild-type. All these results were mainly performed on mutated F508del CFTR protein and should be also performed on other class mutations. The implication of miRNAs in CFTR expression is also controlled by the highly variable, and compelling information on phenotypic variability and lack of genotype-phenotype correlation among patients with the same mutation in the CFTR gene. Thus, three polymorphisms have been identified in the miR-99b/let-7e/miR-125a cluster that modulates the expression of these miRNAs and may be associated with patient phenotypes (Endale Ahanda et al., 2015). In addition, polymorphisms present in the 3′-UTR region of CFTR mediate the binding of miR-509-3p and cause a decrease in CFTR expression (Amato et al., 2013).

Expression of miRNAs can also regulate the expression of other channels or others proteins whose activity is modulated by CFTR (**Table 2**), such as the cotransporter NKCC1 ($Na^+-K^+-2Cl^-$-cotransport protein) (Gillen et al., 2011) or the sodium channel ENaC (epithelial sodium channel) by miR-183, which is able to target the three subunit of ENaC (Kim et al., 2017). Recently, an increase in the expression of miR-9 was at the root of a decrease in expression of the chloride channel, ANO1, which modulated mucus hydration and chloride efflux activity (Sonneville et al., 2017).

miRNAs: OBSTRUCTION, INFECTION, AND INFLAMMATION

In recent years, studies showing the involvement of miRNAs in the regulation of other targets involved in various aspects of the pathology, such as inflammation, airway obstruction or infection, have opened up new ways of investigation. In fact, miRNAs are able to modulate the expression of genes involved in airway obstruction and the production of mucus, such as miR-146a modulating *MUC5AC*, which encodes one of the main pulmonary mucins implicated in the obstruction of the airway. The data highlight a negative feedback role for miR-146a in the control of MUC5AC production from airway epithelial cells stimulated by neutrophil elastase, which may be associated with the inactivation of MAP kinase and NF-κB signaling, the primary pathways implicated in CF airway inflammation (Zhong et al., 2011). The expression of miR-101 in the airways is therefore increased in the lungs of patients with CF, with an airway obstruction characterized by low levels of

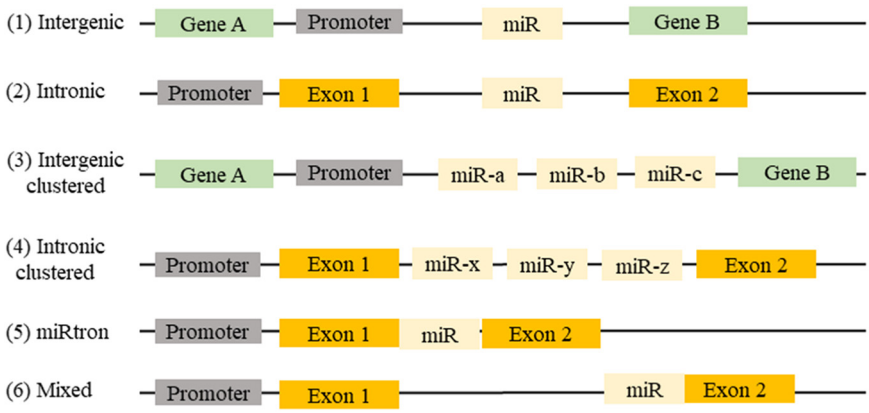


FIGURE 1 | Location of miRNAs gene in the genome: (1) miRNAs can be found between two genes (intergenic) or (2) in a gene (intronic). (3) They may be present in a single miRNA gene or (4) in a cluster of miRNA genes. (5) Sometimes intronic miRNAs may exist between two exons (miRtron) or (6) overlapping an exon and an intron of non-coding genes (mixed).

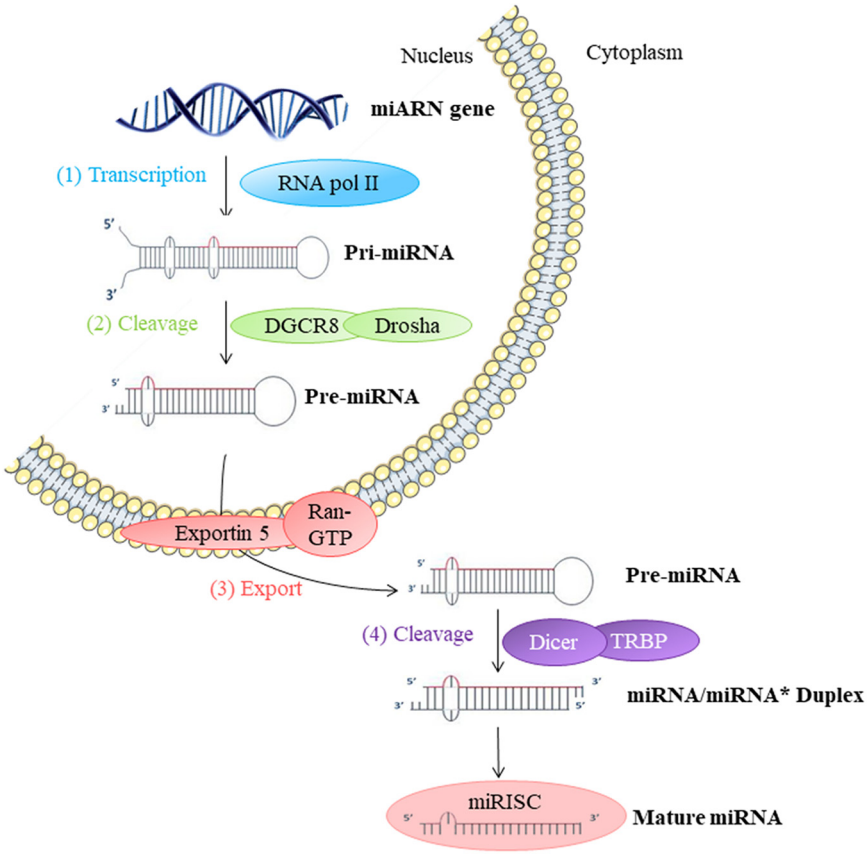


FIGURE 2 | Biosynthesis of miRNAs: (1) The biosynthesis begins in the nucleus by transcription of miRNA genes by RNA polymerase II (Pol II). (2) Long transcripts, pri-miRNA, are cleaved by Drosha and DGCR8 protein creating pre-miRNA with hairpin structure. (3) Exportin 5 transfers pre-miRNA into the cytoplasm. (4) Pre-miRNA is cleaved by Dicer into miRNA duplex in mature single-strand miRNA form. This miRNA mature form is incorporated into a miRISC ribonucleoprotein complex. This complex can then act directly on the mRNA in the cell where it is synthesized or out of the cell.

CFTR (Hassan et al., 2012) expression. miRNA expression is also influenced by external factors, like pathogenic bacteria, such as *Haemophilus influenza, Staphylococcus aureus,* or *Pseudomonas aeruginosa* (Oglesby et al., 2013; Ramachandran et al., 2013). The presence of pathogens in the light of CF airway surface epithelium contributes to modulate miR expression and consequently CFTR

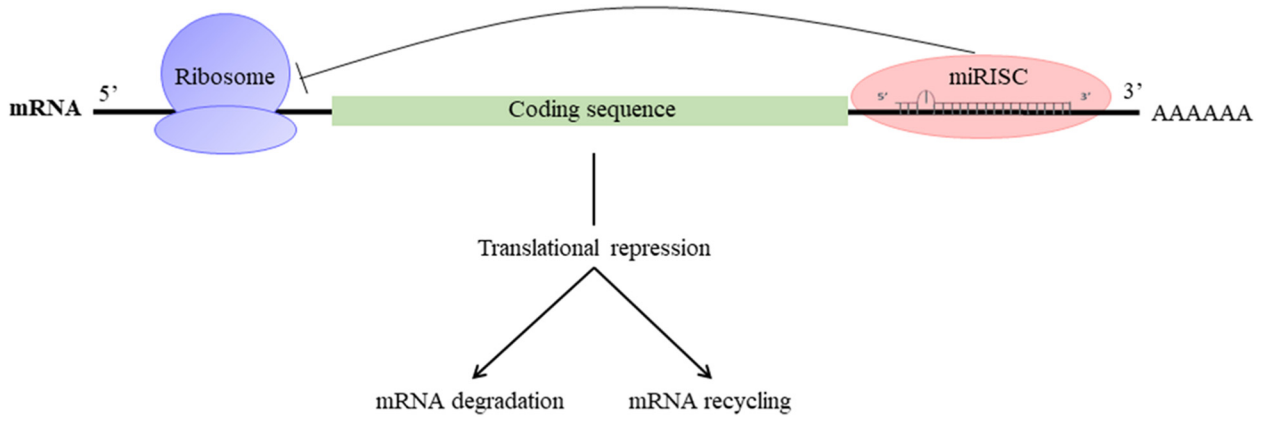


FIGURE 3 | Mechanism of action of miRNAs: miRISC complex attenuates mRNA translation and leads to the destabilization of mRNA by deadenylation and/or inhibition of translation.

TABLE 1 | Table showing deregulated miRNAs targeting directly or indirectly CFTR in the context of cystic fibrosis.

Target	miRNA	Models	Reference	Year
CFTR mRNA	miR-494, miR-384, miR-376b, miR-1246, miR-145, miR-331-3p et miR-939	Caco-2	Gillen et al., 2011	2011
	miR-600, miR-494, miR-384, miR-1290, miR-1246, miR-145, miR-1827, miR-331-3p et miR-939	PANC-1		
	miR-600, miR-494, miR-607 et miR-384	16HBE14o-		
	miR-101, miR-494	HEK293	Megiorni et al., 2011	
	miR-101, miR-144	16HBE14o-	Hassan et al., 2012	2012
	miR-145, miR-223, miR-494	Bronchial brushing, 16HBE14o-, CFBE41o-, HEK293	Oglesby et al., 2013	2013
	miR-509-3p, miR-494	Differentiated primary cell cultures, Calu-3	Ramachandran et al., 2013	
	miR-145, miR-384, miR-101, miR-600	A549	Viart et al., 2015	2015
	miR-505, miR-943, miR-377, miR-384, miR-101, miR-600	Beas-2B		
	miR-600	HBEpiC		
	groupe miR-17-92	Human macrophages	Tazi et al., 2016	2016
	miR-145-5p	Calu-3	Fabbri et al., 2017	2017
	miR-200b	Calu-3, 16HBE14o-	Bartoszewska et al., 2017	
	miR-145	CF and non-CF differentiated primary cell cultures	Lutful Kabir et al., 2017	
CFTR mRNA through SIN3A mRNA	miR-138	Differentiated primary cell cultures, Calu-3, HEK293, HeLa	Ramachandran et al., 2012	2012

expression. In an infectious diseases context (e.g., in the presence of *P. aeruginosa*), miR-93 expression, which is decreased, is associated with stabilization of IL-8 mRNA, thereby contributing to the maintenance of the inflammatory state. Altogether, the different works highlighted some complexes regulation and needed further investigation (Fabbri et al., 2014).

In the airways, inflammatory processes controlled by NF-κB are also partially regulated by miRNAs. The miR-199a-3p expression in the airway, which is decreased in CF context, is associated with an NF-κB hyperactivation. In fact, miR-199a-3p directly regulates IKKβ, which acts on the NF-κB signaling pathway and therefore on IL-8 secretion, the main cytokine dysregulated in the airways of CF patients (Bardin et al., 2018). Moreover, miR-509-3p, miR-494, and miR-126 directly target NF-κB and have shown that CFTR expression and function decreases when NF-κB is functional (McKiernan et al., 2013; Ramachandran et al., 2013). The two miR-93 and miR-17 regulate the production of IL-8 in bronchial epithelial cells (Fabbri et al., 2014; Oglesby et al., 2015). Bhattacharyya et al. (2011) therefore showed that miR-155 expression was

TABLE 2 | Table showing deregulated miRNAs direct/indirect targeting others targets in the context of cystic fibrosis.

miRNA	Target	Models	Reference	Year
miR-126	TOM1 Target of Myb1 Membrane Trafficking Protein	Bronchial brushing, 16HBE14o-, CFBE41o-, HEK293	Oglesby et al., 2010	2010
miR-155	SHIP1 (indirect: IL-8) SH-2 containing inositol 5′ polyphosphatase 1	IB-3, S9	Bhattacharyya et al., 2011	2011
miR-101, miR-1246, miR-494 et miR-384	SLC12A2 Solute Carrier family 12 Member 2	PANC-1	Gillen et al., 2011	
miR-449	Notch1 Notch homolog 1	Differentiated primary cell cultures	Marcet et al., 2011	
miR-146a	MUC5AC Mucin 5 AC	16HBE14o-	Zhong et al., 2011	
miR-145	SMAD3 Mothers Against Decapentaplegic homolog 3	Nasal epithelium cells, HEK293	Megiorni et al., 2013	2013
miR-31	IRF1 (indirect: Cathepsin 5) Interferon Regulatory Factor 1	Differentiated primary cell cultures	Weldon et al., 2014	2014
miR-93	IL-8 Interleukin 8	IB3-1, CuFi-1, NuLi-1	Fabbri et al., 2014	
miR-17	IL-8	Bronchial brushing, 16HBE14o-, CFBE41o-, HEK293	Oglesby et al., 2015	2015
miR-221	ATF6 Activating Transcription Factor 6			
miR-199a-5p	CAV1 Caveolin 1	Human and murine macrophages from lungs	Zhang et al., 2015	
miR-155	RPTOR Regulatory Associated Protein of mTOR complex	IB3-1, S9	Tsuchiya et al., 2016	2016
miR-199a-5p	TβRII TGF beta receptor II	Stellar hepatic cells	Chen et al., 2016	
miR-1343	TGF-β receptor	A549, 16HBE14o-, Caco-2	Stolzenburg et al., 2016	
miR-145	TGF-β Transforming growth factor beta	Primary cells from CF and non-CF patients	Lutful Kabir et al., 2017	
miR-183	SCNN1α,β,γ Sodium Channel Epithelial 1 alpha, beta, gamma subunit	CFBE41o-	Kim et al., 2017	2017
miR-9	ANO1 Anoctamin 1 (TMEM16A)	16HBE14o-, CFBE41o-	Sonneville et al., 2017	
miR-199a-3p	IKKβ Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in beta cells, kinase beta	CFBE41o-	Bardin et al., 2018	2018

associated with CFTR activity. This miRNA can directly regulate SHIP1 (SH-2 containing inositol 5′ polyphosphatase 1) and indirectly alter the expression of IL-8 through activation of the signaling pathway involving PI3K/Akt (phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B) and inhibition of the MAPKs (mitogen-activated protein kinases) (Bhattacharyya et al., 2011). The origin of the deregulation of miR-155 expression in CF cells is mediated by TTP (tristetraprolin) and KSRP (KH-type splicing regulatory protein) known to regulate miRNA biogenesis. The origin of this miRNAs dysregulation needs to be assessed. Some miRNAs may participate in the remodeling of the pulmonary epithelium and have a significant role in the development of the pathophysiology of the disease. Expression of miR-449 in the respiratory epithelium is essential to inducing direct inhibition of the Notch pathway and modulation of that involving the small GTPases, two events necessary for the production of motile cilia the beating of which allows mucus to be evacuated (Marcet et al., 2011; Chevalier et al., 2015). The remodeling of the pulmonary epithelium can also be caused by deregulation of TGF-β (transforming growth factor-beta) pathway, both in the expression of its receptors (TGF-βR1 and R2), and in signaling intermediates such as RPTOR (regulatory associated of mTOR complex 1) resulting in increased fibrosis and CTGF (connective tissue growth factor) or SMAD proteins, respectively through miR-1343, miR-155 and miR-145, thereby affecting fibrotic markers, cell migration and epithelial-mesenchymal transition (Stolzenburg et al., 2016; Tsuchiya et al., 2016; Fabbri et al., 2017). The deregulation of miR-31 in the airways of patients with CF contributes to pulmonary inflammation by increasing the activity of cathepsin 5, which causes antimicrobial proteins to deteriorate (Weldon et al., 2014). As for miR-221, it controls the transcription factor *ATF6* (activating transcription factor 6), which is involved in inflammation caused by endoplasmic reticulum stress (Oglesby et al., 2015). At last, miR-199a-5p regulates caveolin 1 (CAV1), a protein involved in the resolution of inflammation processes, targeting the PI3K/Akt/CAV1 axis (Zhang et al., 2015) and the TGF-β pathway (Lino Cardenas et al., 2013). Furthermore, it has been shown that Celecoxib, which modulates the Akt/miR-199a-5p/CAV1 axis, improves pulmonary hyper-inflammation caused by macrophages in patients.

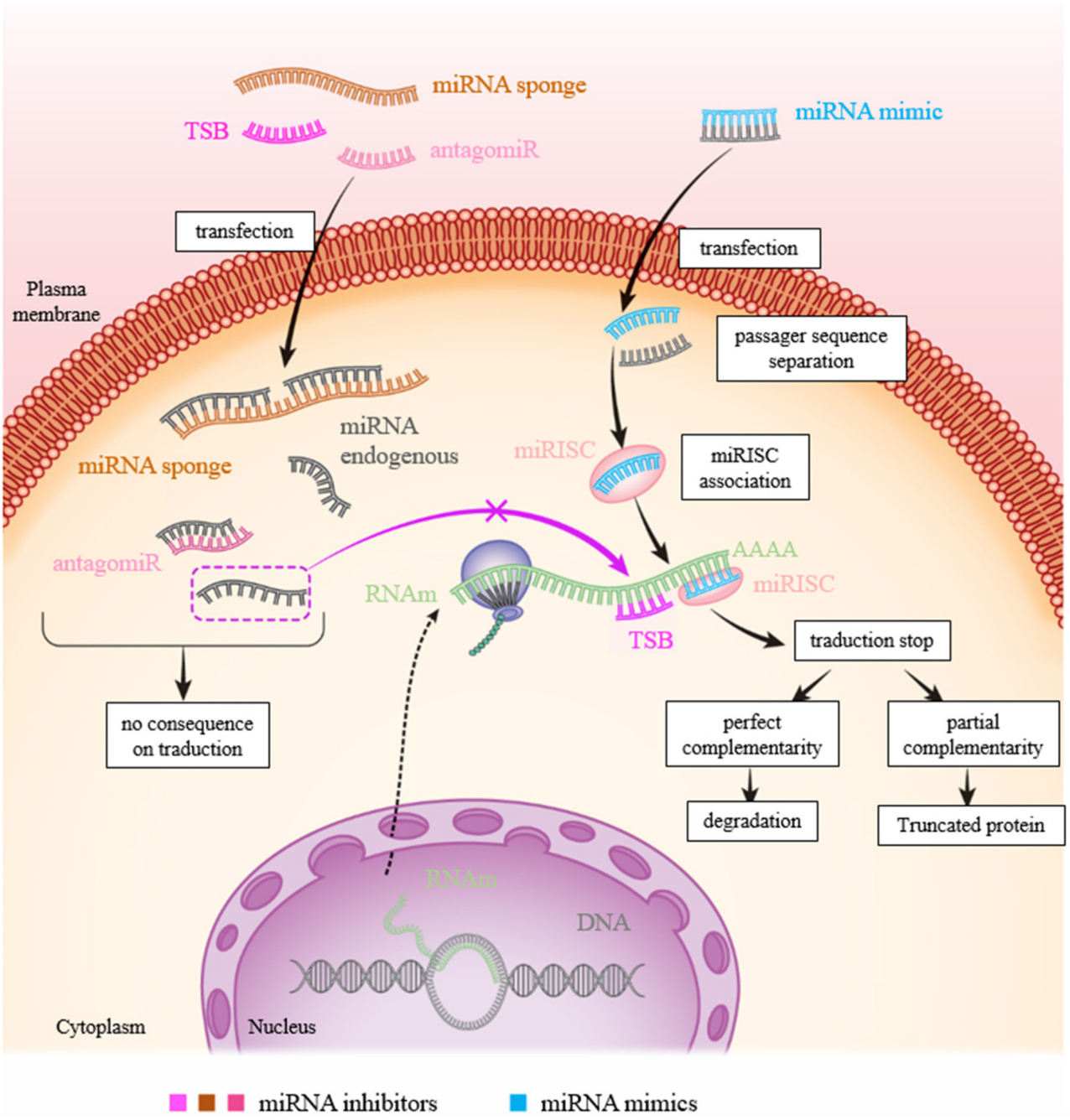


FIGURE 4 | Figure showing the various approaches to inhibit or mimic a miRNA. In physiological condition: the miRNA will bind to the 3′-UTR of its target to inhibit translation resulting to RNA degradation and/or mRNA recycling. To inhibit a miR action, there are three possibilities: transfection of (1) miRNA inhibitor (antagomiR): the miRNA inhibitor binds to the latter by complementarity and prevents its action on its target; (2) TSB: the TSB specifically binds to the 3′-UTR of the target mRNA at the miRNA binding site, the miRNA can then no longer attach to it and exert its action; and (3) mRNA sponge: the miRNA is saturated by the miRNA sponge which contains many miRNA complementary sequences, the miRNA can then no longer attach itself to its target. To increase the expression of a miR, transfection of a mimic of this miR is sufficient to inhibit translation of mRNA.

miRNAs: THERAPEUTIC STRATEGIES

MicroRNAs (miRNAs) are now considered as potential therapeutic targets. Two approaches have been followed for developing therapies based on their use: antagonists also called antisense oligonucleotides (ASOs) including inhibitors, miR sponges and target site blocker [TSB]) and miRNA mimics (**Figure 4**).

miRNA mimics are RNAs mimicking endogenous molecules and helping amplify their function. They are used to restore a loss

of function. The purpose of this so-called "miRNA replacement therapy" approach is to reintroduce miRNAs whose expression is reduced in a pathological context. The proof of concept of this miRNA replacement therapy has been demonstrated with the use of miRNA tumor suppressors that stimulate anti-oncogenic signaling pathways and lead to the eradication of tumor cells (Wiggins et al., 2010). Let-7 and miR-34 mimics are currently in the clinical development phase to target a broad spectrum of tumors. The first molecule aimed at increasing the expression of miR-34 through the use of a mimic (MRX34) entered phase I clinical trials in 2013, as part of studies on multiple solid tumors (Bouchie, 2013). The main limitation of this approach is the difficulty formulating the mimic for its delivery to the target cells. One of the existing strategies to remedy, this is their coupling to nanoparticles. In the clinical trial using MRX34, the mimic is encapsulated in a liposome delivery system to facilitate its uptake by the target cells (Bouchie, 2013). An alternative approach uses delivery through miRNA expression vectors using adenovirus infection as previously described in a cancer therapy approach (Kota and Balasubramanian, 2010).

As for miRNA antagonists, they are used to inhibit endogenous miRNAs that show a-gain-of function in a pathological context. These therapies are similar to using siRNA (small interfering RNA), even through the regulatory systems involved are different. The miRNA antagonist or antagomiR (also called antimiR) binds to the mature miRNA targets with a powerful affinity. The duplex thus formed will then deteriorate. The main disadvantage of this type of therapy is that a miRNA can regulate the expression of several genes. Inhibition of a miRNA, which is nonspecific for a particular gene, can thus result in many side effects (**Figure 4**). TSB are antisense oligonucleotides designed to bind perfectly to the region of the 3′-UTR complementary to the miRNA.

Recent developments on miRNAs have accelerated the evolution of methods and chemical modifications that make it possible to inhibit miRNAs in a stable manner, and to optimize their delivery. These are locked nucleic acids (LNA), peptide nucleic acids (PNA), phosphorothioate groups, miRNA sponges and nanoparticles (McKiernan et al., 2013; Nguyen and Chang, 2017). Phosphorothioate oligonucleotides increase the resistance to 3′-exonuclease hydrolysis and bind more promiscuously and with higher affinity to proteins than antisense oligonucleotides with phosphodiester linkages, which are present in natural DNA and RNA (Gilar et al., 1998; Crooke et al., 2017).

The base constituting the LNA is a nucleic acid analog in which the ribose ring is chemically modified with through the introduction of a methylene bridge. This chemical modification provides the molecule with great thermodynamic stability and prevents its deterioration by nucleases by reinforcing its affinity for its target (Lindow and Kauppinen, 2012).

miRNA sponges are constructs, or RNAs, which have several binding sites for a miRNA of interest, which makes it possible to limit its availability and therefore its action on associated targets (**Figure 4**). In melanoma, TYRP1 (tyrosinase-related protein 1) RNA acts like a sponge which, when associated with miR-16, limits its tumor suppressor activity. Inhibition of the targets with a binding blocker allows miR-16 to act on its target RAB17 and prevents cell proliferation (Gilot et al., 2017). This type of approach using the properties of miRNA sponges and LNA could be considered for therapeutic purposes.

The primary route of administration for oligonucleotides for systemic applications is by parenteral injection, including intravenous (IV) or subcutaneous injection (SCI). Following systemic administration, phosphorothioate-modified single-stranded ASOs rapidly transfer from the blood into tissues (minutes to hours). Following SC administration, ASOs are rapidly absorbed from the injection site into the circulation with peak plasma concentrations consistently reached within 3 to 4 h, followed by a much slower terminal elimination phase (half-life of up to several weeks). Cell uptake is predominantly mediated by endocytosis. The substitution of one non-bridging oxygen with the more hydrophobic sulfur atom, as phosphorothioate, increases both plasma stability and plasma protein binding and thus, ultimately, tissue bioavailability (Yu et al., 2013).

Pharmacokinetic properties of ASOs are similar across species and gender that facilitate drug development (Yu et al., 2007). In the case with all second-generation ASOs and for all animal species evaluated, ASOs distributes broadly into most tissues with the exception of the central nervous system after systemic administration. The major systemic tissues of distribution include liver, kidney, bone marrow, adipocytes (cell body but not lipid fraction), and lymph nodes (Geary et al., 2015). Once intracellular, ASOs exhibit long half-lives (2–4 weeks) and prolonged activity in suppressing or altering expression of their target RNA. Few data are available about the oral route of administration, because this strategy requires profound modification of the formulation for the delivery. An *in vivo* study have compared IV and oral administration of an ASO and demonstrated that the tissue distribution profile was similar following both routes of administration, with highest concentrations observed in the kidney followed by the liver, lymph nodes and spleen (Raoof et al., 2004). In the case of CF, inhaled ASOs could be considered because the lung remains the primary target and to dismissed side effects but we currently have no setback on this approach, which has only been carried out by two teams targeting chloride ion channels with modified activity in CF (Crosby et al., 2017; Sonneville et al., 2017).

The first clinical antagonist developed in clinical studies, miravirsen (SPC3649), is an antimiR-122, which targets and sequesters liver-specific miR-122. MiR-122 binds to the 5′-UTR of the hepatitis C virus (HCV) mRNA that it stabilizes, causing the virus to accumulate. Miravirsen has the advantage of being coupled to an LNA base (making it resistant to nucleases) and having phosphorothioate linkages. Miravirsen was initially tested in mice and African green monkeys (Elmen et al., 2008). Its action was then studied in chimpanzees chronically infected with HCV, and a prolonged decrease in viral replication, without any evidence of viral resistance or side effects, was observed in the treated animals. In 2011–2012, a phase IIa study was conducted in patients with chronic hepatitis C who received five SCIs per week of miravirsen for a period of 29 days. This

clinical study showed a prolonged, dose-dependent decrease in viral RNA levels and cholesterol levels and a change in the expression of about 100 genes in the liver. Viral RNA levels became undetectable in five patients, with, however, a rebound in the virus's expression in some of them (van der Ree et al., 2014). The variability of responses observed in patients suggests, however, that viral and/or host factors would influence response to treatment with miravirsen. Recently, a 5′-UTR C3U nucleotide change in HCV mRNA was demonstrated in patients who had a viral replication rebound (Ottosen et al., 2015). This mutant C3U is, in fact, insensitive to miravirsen. It would, therefore, make the virus independent of miR-122; the virus would then use an alternative mechanism to stabilize and replicate itself. The decrease in plasma levels of miR-122 in patients is still observed two months after the last injection of miravirsen, most likely due to the long half-life of miravirsen in tissues (about 30 days) (Matthes et al., 2016). Two pharmaceutical companies (*Roche* and *Regulus Therapeutics*) are currently involved in clinical trials to treat the HCV using antimiR-122.

In the case of CF, a team used TSBs which, by binding to the 3′-UTR of CFTR mRNA, prevents the binding of miR-101 and miR-145. The transfection of these molecules into the bronchial epithelial cells of patients with CF leads to an increase in CFTR expression and activity, suggesting that these TSBs could be used therapeutically (Viart et al., 2015). Other targets are being considered, like the protein ANO1 which, like CFTR, is involved in the secretion of chloride ions, pH regulation and the fluidity of airway surface liquid (Ruffin et al., 2013; Jun et al., 2016). It has shown that a TSB specifically preventing the binding of a miRNA (miR-9) on the 3′-UTR of the mRNA of the alternative chloride channel ANO1, made it possible, in *in vitro* and *in vivo* models, to increase its expression, and also its chloride activity, and cell migration, as well as mucociliary clearance independently of intracellular calcium concentration (Sonneville et al., 2017). The restoration of these parameters, deregulated at a physiological level, makes it possible to now propose the TSB ANO1 as a potential therapeutic target in the context of CF. Each patient would be able to benefit from this type of approach leading to the activation of a chloride secretion independent of CFTR. In this study, the TSB ANO1 was administered to animals intranasally, if this molecule were to be used in humans, its mode of administration would need to be determined. Inhalation seems to be the most appropriate method since these patients often have lung damage. Tissue-specific, it has less systemic exposure, reducing the risk of side effects. However, the patients' lungs have barriers, such as airways that are obstructed by mucus, that can make administration difficult. The passage of TSBs through the mucus therefore still needs to be studied.

CONCLUSION

Despite the improved care and recent progress in the identification of new therapies the predicted median survival of CF patients still remains in the low 40-years range in developed countries. New therapies and new strategies, alone or in combination with established therapies, are needed to prolong survival and improve the quality of life for all CF patients. The potential for modulating gene expression by the use of antisense oligonucleotides has become increasingly interesting in recent years, but safe delivery, long-term efficacy and side effects of prolonged treatment still need to be assessed. Advances in chemistry and molecular biology have provided the basis to develop antisense oligodeoxynucleotides and improve their selectivity, stability, and specificity of action. The antisense oligonucleotide drug platform is a really new approach for drug discovery, but basic science must be improved notably in understanding the molecular mechanisms that regulate CFTR and other chloride channels. Therapies targeting CFTR increase with ASO should be limited because channel increase will not necessarily induce increased activity especially for class III to VI mutations. The ease of delivery of modified antisense oligonucleotides seems to be linked with a lack of any major adverse side effects, making antisense oligonucleotides suitable candidates as a potential treatment for CF diseases.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PB, FS, and OT wrote the manuscript. PB, FS, HC, and OT participated in the design of this manuscript.

FUNDING

This research group was funded by grants from Inserm, Sorbonne University, sciences faculty (UPMC Paris 06) and the French non-profit organization "Vaincre la Mucoviscidose." PB received a Ph.D. fellowship from the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" in France. FS obtained a grant from the SATT Lutech and "Vaincre la Mucoviscidose."

REFERENCES

Amato, F., Seia, M., Giordano, S., Elce, A., Zarrilli, F., Castaldo, G., et al. (2013). Gene mutation in microRNA target sites of CFTR gene: a novel pathogenetic mechanism in cystic fibrosis? *PLoS One* 8:e60448. doi: 10.1371/journal.pone.0060448

Bardin, P., Marchal-Duval, E., Sonneville, F., Blouquit-Laye, S., Rousselet, N., Le Rouzic, P., et al. (2018). Small RNA and transcriptome sequencing reveal the role of miR-199a-3p in inflammatory processes in cystic fibrosis airways. *J. Pathol.* 245, 410–420. doi: 10.1002/path.5095

Bartoszewska, S., Kamysz, W., Jakiela, B., Sanak, M., Kroliczewski, J., Bebok, Z., et al. (2017). miR-200b downregulates CFTR during hypoxia in human lung epithelial cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 22:23. doi: 10.1186/s11658-017-0054-0

Benedetto, R., Ousingsawat, J., Wanitchakool, P., Zhang, Y., Holtzman, M. J., Amaral, M., et al. (2017). Epithelial chloride transport by CFTR Requires TMEM16A. *Sci. Rep.* 7:12397. doi: 10.1038/s41598-017-10910-0

Bessonova, L., Volkova, N., Higgins, M., Bengtsson, L., Tian, S., Simard, C., et al. (2018). Data from the US and UK cystic fibrosis registries support disease modification by CFTR modulation with ivacaftor. *Thorax* 73, 731–740. doi: 10.1136/thoraxjnl-2017-210394

Bhattacharyya, S., Balakathiresan, N. S., Dalgard, C., Gutti, U., Armistead, D., Jozwik, C., et al. (2011). Elevated miR-155 promotes inflammation in cystic fibrosis by driving hyperexpression of interleukin-8. *J. Biol. Chem.* 286, 11604–11615. doi: 10.1074/jbc.M110.198390

Bouchie, A. (2013). First microRNA mimic enters clinic. *Nat. Biotechnol.* 31:577. doi: 10.1038/nbt0713-577

Caputo, A., Caci, E., Ferrera, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., et al. (2008). TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 322, 590–594. doi: 10.1126/science.1163518

Chen, L., Chen, R., Velazquez, V. M., and Brigstock, D. R. (2016). Fibrogenic signaling is suppressed in hepatic stellate cells through targeting of connective tissue growth factor (CCN2) by cellular or exosomal MicroRNA-199a-5p. *Am. J. Pathol.* 186, 2921–2933. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.07.011

Chevalier, B., Adamiok, A., Mercey, O., Revinski, D. R., Zaragosi, L. E., Pasini, A., et al. (2015). miR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nat. Commun.* 6:8386. doi: 10.1038/ncomms9386

Corvol, H., Thompson, K. E., Tabary, O., le Rouzic, P., and Guillot, L. (2016). Translating the genetics of cystic fibrosis to personalized medicine. *Transl. Res.* 168, 40–49. doi: 10.1016/j.trsl.2015.04.008

Crooke, S. T., Wang, S., Vickers, T. A., Shen, W., and Liang, X. H. (2017). Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* 35, 230–237. doi: 10.1038/nbt.3779

Crosby, J. R., Zhao, C., Jiang, C., Bai, D., Katz, M., Greenlee, S., et al. (2017). Inhaled ENaC antisense oligonucleotide ameliorates cystic fibrosis-like lung disease in mice. *J. Cyst. Fibros* 16, 671–680. doi: 10.1016/j.jcf.2017.05.003

Elmen, J., Lindow, M., Schutz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., et al. (2008). LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452, 896–899. doi: 10.1038/nature06783

Endale Ahanda, M.-L., Bienvenu, T., Sermet-Gaudelus, I., Mazzolini, L., Edelman, A., Zoorob, R., et al. (2015). The hsa-miR-125a/hsa-let-7e/hsa-miR-99b cluster is potentially implicated in cystic fibrosis pathogenesis. *J. Cyst. Fibros* 14, 571–579. doi: 10.1016/j.jcf.2015.02.011

Fabbri, E., Borgatti, M., Montagner, G., Bianchi, N., Finotti, A., Lampronti, I., et al. (2014). Expression of miR-93 and IL-8 during *Pseudomonas aeruginosa* mediated induction of Pro-Inflammatory responses. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 50, 1144–1155. doi: 10.1165/rcmb.2013-0160OC

Fabbri, E., Tamanini, A., Jakova, T., Gasparello, J., Manicardi, A., Corradini, R., et al. (2017). A peptide nucleic acid against MicroRNA miR-145-5p enhances the expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in Calu-3 cells. *Molecules* 23:E71. doi: 10.3390/molecules23010071

Fanen, P., Wohlhuter-Haddad, A., and Hinzpeter, A. (2014). Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 52, 94–102. doi: 10.1016/j.biocel.2014.02.023

Foster, P. S., Plank, M., Collison, A., Tay, H. L., Kaiko, G. E., Li, J., et al. (2013). The emerging role of microRNAs in regulating immune and inflammatory responses in the lung. *Immunol. Rev.* 253, 198–215. doi: 10.1111/imr.12058

Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105. doi: 10.1101/gr.082701.108

Geary, R. S., Norris, D., Yu, R., and Bennett, C. F. (2015). Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 87, 46–51. doi: 10.1016/j.addr.2015.01.008

Gilar, M., Belenky, A., Budman, Y., Smisek, D. L., and Cohen, A. S. (1998). Study of phosphorothioate-modified oligonucleotide resistance to 3′-exonuclease using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 714, 13–20.

Gillen, A. E., Gosalia, N., Leir, S. H., and Harris, A. (2011). MicroRNA regulation of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Biochem. J.* 438, 25–32. doi: 10.1042/BJ20110672

Gilot, D., Migault, M., Bachelot, L., Journe, F., Rogiers, A., Donnou-Fournet, E., et al. (2017). A non-coding function of TYRP1 mRNA promotes melanoma growth. *Nat. Cell Biol.* 19, 1348–1357. doi: 10.1038/ncb3623

Gulland, A. (2016). Cystic fibrosis drug is not cost effective, says NICE. *BMJ* 353:i3409. doi: 10.1136/bmj.i3409

Hassan, F., Nuovo, G. J., Crawford, M., Boyaka, P. N., Kirkby, S., Nana-Sinkam, S. P., et al. (2012). MiR-101 and miR-144 regulate the expression of the CFTR chloride channel in the lung. *PLoS One* 7:e50837. doi: 10.1371/journal.pone.0050837

Jacquot, J., Tabary, O., and Clement, A. (2008). Hyperinflammation in airways of cystic fibrosis patients: what's new? *Expert Rev. Mol. Diagn.* 8, 359–363.

Jun, I., Cheng, M. H., Sim, E., Jung, J., Suh, B. L., Kim, Y., et al. (2016). Pore dilatation increases the bicarbonate permeability of CFTR, ANO1 and glycine receptor anion channels. *J. Physiol.* 594, 2929–2955. doi: 10.1113/JP271311

Kim, K., Hung, R. J., and Perrimon, N. (2017). miR-263a regulates ENaC to maintain osmotic and intestinal stem cell homeostasis in *Drosophila*. *Dev. Cell* 40, 23–36. doi: 10.1016/j.devcel.2016.11.023

Kota, S. K., and Balasubramanian, S. (2010). Cancer therapy via modulation of micro RNA levels: a promising future. *Drug Discov. Today* 15, 733–740. doi: 10.1016/j.drudis.2010.07.003

Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 42, D68–D73. doi: 10.1093/nar/gkt1181

Lindow, M., and Kauppinen, S. (2012). Discovering the first microRNA-targeted drug. *J. Cell Biol.* 199, 407–412. doi: 10.1083/jcb.201208082

Lino Cardenas, C. L., Henaoui, I. S., Courcot, E., Roderburg, C., Cauffiez, C., Aubert, S., et al. (2013). miR-199a-5p Is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation by targeting caveolin-1. *PLoS Genet.* 9:e1003291. doi: 10.1371/journal.pgen.1003291

Lutful Kabir, F., Ambalavanan, N., Liu, G., Li, P., Solomon, G. M., Lal, C. V., et al. (2017). microRNA-145 antagonism reverses TGF-beta inhibition of F508del CFTR correction in airway epithelia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 197, 632–643. doi: 10.1164/rccm.201704-0732OC

Marcet, B., Chevalier, B., Luxardi, G., Coraux, C., Zaragosi, L. E., Cibois, M., et al. (2011). Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat. Cell Biol.* 13, 693–699. doi: 10.1038/ncb2241

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

Matthes, E., Goepp, J., Carlile, G. W., Luo, Y., Dejgaard, K., Billet, A., et al. (2016). Low free drug concentration prevents inhibition of F508del CFTR functional expression by the potentiator VX-770 (ivacaftor). *Br. J. Pharmacol.* 173, 459–470. doi: 10.1111/bph.13365

McKiernan, P., Cunningham, O., Greene, C., and Cryan, S. (2013). Targeting miRNA-based medicines to cystic fibrosis airway epithelial cells using nanotechnology. *Int. J. Nanomed.* 8, 3907–3915. doi: 10.2147/IJN.S47551

Megiorni, F., Cialfi, S., Cimino, G., De Biase, R. V., Dominici, C., Quattrucci, S., et al. (2013). Elevated levels of miR-145 correlate with SMAD3 down-regulation in Cystic Fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros* 12, 797–802. doi: 10.1016/j.jcf.2013.03.007

Megiorni, F., Cialfi, S., Dominici, C., Quattrucci, S., and Pizzuti, A. (2011). Synergistic post-transcriptional regulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) by miR-101 and miR-494 specific binding. *PLoS One* 6:e26601. doi: 10.1371/journal.pone.0026601

Mercey, O., Popa, A., Cavard, A., Paquet, A., Chevalier, B., Pons, N., et al. (2017). Characterizing isomiR variants within the microRNA-34/449 family. *FEBS Lett.* 591, 693–705. doi: 10.1002/1873-3468.12595

Nguyen, D. D., and Chang, S. (2017). Development of novel therapeutic agents by inhibition of oncogenic microRNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 19:E65. doi: 10.3390/ijms19010065

Oglesby, I. K., Bray, I. M., Chotirmall, S. H., Stallings, R. L., O'Neill, S. J., McElvaney, N. G., et al. (2010). miR-126 is downregulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression. *J. Immunol.* 184, 1702–1709. doi: 10.4049/jimmunol.0902669

Oglesby, I. K., Chotirmall, S. H., McElvaney, N. G., and Greene, C. M. (2013). Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by MicroRNA-145, -223, and -494 is altered in DeltaF508 cystic fibrosis airway epithelium. *J. Immunol.* 190, 3354–3362. doi: 10.4049/jimmunol.1202960

Oglesby, I. K., Vencken, S. F., Agrawal, R., Gaughan, K., Molloy, K., Higgins, G., et al. (2015). miR-17 overexpression in cystic fibrosis airway epithelial cells

decreases interleukin-8 production. *Eur. Respir. J.* 46, 1350–1360. doi: 10.1183/09031936.00163414

Ottosen, S., Parsley, T. B., Yang, L., Zeh, K., van Doorn, L. J., van der Veer, E., et al. (2015). In vitro antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of miravirsen, a novel anti-hepatitis C virus therapeutic targeting the human factor miR-122. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 599–608. doi: 10.1128/AAC.04220-14

Ramachandran, S., Karp, P. H., Jiang, P., Ostedgaard, L. S., Walz, A. E., Fisher, J. T., et al. (2012). A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and DeltaF508 mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 13362–13367. doi: 10.1073/pnas.1210906109

Ramachandran, S., Karp, P. H., Osterhaus, S. R., Jiang, P., Wohlford-Lenane, C., Lennox, K. A., et al. (2013). Post-Transcriptional regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and function by MicroRNAs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49, 544–551. doi: 10.1165/rcmb.2012-0430OC

Raoof, A. A., Chiu, P., Ramtoola, Z., Cumming, I. K., Teng, C., Weinbach, S. P., et al. (2004). Oral bioavailability and multiple dose tolerability of an antisense oligonucleotide tablet formulated with sodium caprate. *J. Pharm. Sci.* 93, 1431–1439. doi: 10.1002/jps.20051

Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066–1073.

Rosenfeld, M., Wainwright, C. E., Higgins, M., Wang, L. T., McKee, C., Campbell, D., et al. (2018). Ivacaftor treatment of cystic fibrosis in children aged 12 to < 24 months and with a CFTR gating mutation (ARRIVAL): a phase 3 single-arm study. *Lancet Respir. Med.* 6, 545–553. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30202-9

Ruffin, M., Voland, M., Marie, S., Bonora, M., Blanchard, E., Blouquit-Laye, S., et al. (2013). Anoctamin 1 dysregulation alters bronchial epithelial repair in cystic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 2340–2351. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.09.012

Schroeder, B. C., Cheng, T., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2008). Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 134, 1019–1029. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.003

Sonneville, F., Ruffin, M., Coraux, C., Rousselet, N., Rouzic, P. L., Blouquit-Laye, S., et al. (2017). MicroRNA-9 downregulates the ANO1 chloride channel and contributes to cystic fibrosis lung pathology. *Nat. Commun.* 8:710. doi: 10.1038/s41467-017-00813-z

Sonneville, F., Ruffin, M., Guillot, L., Rousselet, N., Le Rouzic, P., Corvol, H., et al. (2015). New insights about miRNAs in cystic fibrosis. *Am. J. Pathol.* 185, 897–908. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.12.022

Stolzenburg, L. R., Wachtel, S., Dang, H., and Harris, A. (2016). miR-1343 attenuates pathways of fibrosis by targeting the TGF-beta receptors. *Biochem. J.* 473, 245–256. doi: 10.1042/BJ20150821

Tazi, M. F., Dakhlallah, D. A., Caution, K., Gerber, M. M., Chang, S. W., Khalil, H., et al. (2016). Elevated Mirc1/Mir17-92 cluster expression negatively regulates autophagy and CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) function in CF macrophages. *Autophagy* 12, 2026–2037. doi: 10.1080/15548627.2016.1217370

Tsuchiya, M., Kalurupalle, S., Kumar, P., Ghoshal, S., Zhang, Y., Lehrmann, E., et al. (2016). RPTOR, a novel target of miR-155, elicits a fibrotic phenotype of cystic fibrosis lung epithelium by upregulating CTGF. *RNA Biol.* 13, 837–847. doi: 10.1080/15476286.2016.1197484

van der Ree, M. H., van der Meer, A. J., de Bruijne, J., Maan, R., van Vliet, A., Welzel, T. M., et al. (2014). Long-term safety and efficacy of microRNA-targeted therapy in chronic hepatitis C patients. *Antiviral Res.* 111, 53–59. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.08.015

Veit, G., Avramescu, R. G., Chiang, A. N., Houck, S. A., Cai, Z., Peters, K. W., et al. (2016). From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol. Biol. Cell* 27, 424–433. doi: 10.1091/mbc.E14-04-0935

Viart, V., Bergougnoux, A., Bonini, J., Varilh, J., Chiron, R., Tabary, O., et al. (2015). Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 45, 116–128. doi: 10.1183/09031936.00113214

Wang, H., and Cai, J. (2017). The role of microRNAs in heart failure. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 2019–2030. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.11.034

Weldon, S., McNally, P., McAuley, D. F., Oglesby, I. K., Wohlford-Lenane, C. L., Bartlett, J. A., et al. (2014). miR-31 dysregulation in cystic fibrosis airways contributes to increased pulmonary cathepsin S production. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190, 165–174. doi: 10.1164/rccm.201311-1986OC

Wiggins, J. F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M., Patrawala, L., Brown, D., et al. (2010). Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res.* 70, 5923–5930. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-100655

Yang, Y. D., Cho, H., Koo, J. Y., Tak, M. H., Cho, Y., Shim, W. S., et al. (2008). TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455, 1210–1215. doi: 10.1038/nature07313

Yu, R. Z., Grundy, J. S., and Geary, R. S. (2013). Clinical pharmacokinetics of second generation antisense oligonucleotides. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 9, 169–182. doi: 10.1517/17425255.2013.737320

Yu, R. Z., Kim, T. W., Hong, A., Watanabe, T. A., Gaus, H. J., and Geary, R. S. (2007). Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B-100. *Drug Metab. Dispos.* 35, 460–468. doi: 10.1124/dmd.106.012401

Zhang, P. X., Cheng, J., Zou, S., D'Souza, A. D., Koff, J. L., Lu, J., et al. (2015). Pharmacological modulation of the AKT/microRNA-199a-5p/CAV1 pathway ameliorates cystic fibrosis lung hyper-inflammation. *Nat. Commun.* 6:6221. doi: 10.1038/ncomms7221

Zhong, T., Perelman, J. M., Kolosov, V. P., and Zhou, X. D. (2011). MiR-146a negatively regulates neutrophil elastase-induced MUC5AC secretion from 16HBE human bronchial epithelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* 358, 249–255. doi: 10.1007/s11010-011-0975-2

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 © 2018 Bardin, Sonneville, Corvol and Tabary. 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) and the copyright owner(s) 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.

Pulmonary inflammation and microRNA role in Cystic Fibrosis

In patients with cystic fibrosis (CF), at the pulmonary level, the ionic imbalance caused by CFTR chloride channel dysfunction leading to a thickening mucus in the airways promoting hyper-inflammation, whose regulatory mechanisms are altered. In this context, the NF-κB pathway is hyper-activated, but the origin of its deregulation remains uncertain that is why we are interested in miRNA.

The aim of this work was to study the role of miRNA in pulmonary pathophysiology in cystic fibrosis patients.

A small RNAseq analyse on bronchial epithelial cells cultured in air-liquid interface from CF patients and non-CF healthy subjects, allowed to identify a miRNA, miR-199a-3p. This miRNA is underexpressed in CF cells and regulates IKKβ directly and consequently the NF-κB pathway activation and IL-8 secretions. In CF cells, we have shown that miR-199a-3p origin is not due to pro-inflammatory context, nor CFTR intrinsic dysfunction but due to intracellular calcium concentration variation whose modulate the miR-199a-3p expression through one of the genes that synthesize it. Moreover, we have shown that the miR-199a-3p expression could be decreased following an infection by *Pseudomonas aeruginosa*, the most frequently found pathogen in CF airways. We have also shown that miR-199a-3p can interact with others dysregulated miRNA in CF, the miR-636 and miR-9 (miR-636 is able too to act on miR-199a-3p). The small RNAseq analysis also identified another miRNA, miR-636 which is overexpressed in CF cells. We have also demonstrated that this miRNA regulates negatively IL1R1 and IKKβ and positively RANK. Overexpression of miR-636 allows decreasing NF-κB pathway activation and IL-8, IL-6 secretions. However, these results are not yet found in CF patient, so we hypothesize that a sponge miRNA or a lncRNA would prevent the action of miR-636 on these targets. The expression of miR-636 is not regulated by *Pseudomonas aeruginosa*. Analysis of the expression of these three miRNA in blood plasma and neutrophils showed that miR-199a-3p was a potential biomarker of plasma and miR-636 and miR-9 potential neutrophil biomarkers in CF patients compared to non-CF healthy subjects.

All these results illustrate the pivotal role of miRNA in lung inflammation in cystic fibrosis patients.

Key words: Cystic Fibrosis – inflammation – miRNA

Work done in the laboratory Inserm UMR_S938 of Pr Fève – Team of Pr Corvol

Centre de Recherche Saint-Antoine, 182 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris

Inflammation pulmonaire et rôle des microARN dans la mucoviscidose

La mucoviscidose (CF pour *Cystic Fibrosis*) est la conséquence de mutations du gène codant pour le canal chlorure CFTR. L'absence de ce canal conduit à des déséquilibres ioniques et hydrique favorisant une hyper-inflammation, dont les mécanismes de régulation sont altérés. Dans ce contexte, la voie de signalisation NF-κB est hyper-activée mais l'origine de cette dérégulation demeure incertaine c'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés aux miARN.

L'objectif de ce travail était d'étudier le rôle des miARN dans la physiopathologie pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose.

Une analyse du miRNome sur des cellules épithéliales bronchiques cultivées en interface air-liquide issues de patients CF et de sujets sains non-CF a permis d'identifier un microARN, miR-199a-3p sous-exprimé dans des cellules CF qui régule directement IKKβ et par conséquent l'activation de la voie NF-κB et la sécrétion en IL-8. Nous avons montré que l'origine de la dérégulation de miR-199a-3p n'était pas due au contexte pro-inflammatoire préexistant, ni à la dysfonction intrinsèque de CFTR mais à des variations calciques intracellulaires qui modulent son expression *via* l'un des gènes le synthétisant. De plus, nous avons montré que l'expression de miR-199a-3p pouvait être diminuée suite à une infection par *Pseudomonas aeruginosa,* le pathogène le plus fréquemment retrouvé dans les voies aériennes des patients CF. Nous avons également montré que le miR-199a-3p pouvait interagir avec d'autres miARN dérégulés dans la mucoviscidose, les miR-636 et miR-9 (miR-636 pouvant aussi agir sur miR-199a-3p). L'analyse du miRNome a aussi permis d'identifier un autre microARN, miR-636 sur-exprimé dans des cellules CF qui régule directement IL1R1 et IKKβ négativement et RANK positivement mais pas FAM13A. La surexpression de miR-636 permet de diminuer l'activation de la voie NF-κB et la sécrétion en IL-8 et IL-6. Pourtant ces résultats ne sont pas retrouvés chez le patient CF, aussi nous émettons l'hypothèse qu'un miARN éponge ou lncARN empêcherait l'action de miR-636 sur ces cibles. Nous avons également montré que l'expression de miR-636 n'est pas régulé par *P. aeruginosa.* L'analyse de l'expression de ces trois miARN dans des plasmas et des neutrophiles sanguins, a permis de montrer que le miR-199a-3p était un potentiel biomarqueur sanguin et les miR-636 et miR-9 de potentiels biomarqueurs neutrophiles chez les patients CF par rapport aux sujets sains non-CF.

L'ensemble de ces résultats illustrent le rôle pivot des miARN dans l'inflammation pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose.

Mots clés : Mucoviscidose – inflammation – miARN – NF-κB – IKKβ – IL1R1 - RANK

Travaux réalisés au sein du laboratoire Inserm UMR_S938 du Pr Fève – Equipe du Pr Corvol

Centre de Recherche Saint-Antoine, 182 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris