



HAL
open science

La protéine Prion cellulaire (PrPC) dans la mucoviscidose : Rôle dans le maintien de la barrière épithéliale bronchique

Johanna Cormenier

► **To cite this version:**

Johanna Cormenier. La protéine Prion cellulaire (PrPC) dans la mucoviscidose : Rôle dans le maintien de la barrière épithéliale bronchique. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV064 . tel-03051788

HAL Id: tel-03051788

<https://theses.hal.science/tel-03051788>

Submitted on 10 Dec 2020

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Johanna CORMENIER

Thèse dirigée par le **Dr Mohamed BENHAROUGA, MCU-HDR-UGA, Grenoble**

Préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux**
Dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

La protéine Prion cellulaire (PrP^C) dans la mucoviscidose : Rôle dans le maintien de la barrière épithéliale bronchique

Thèse soutenue publiquement le **16 décembre 2019**, devant
le jury composé de :



Président :	Dr. Jean-Jacque FEIGE,	INSERM, CEA-Grenoble
Rapporteur :	Pr. Frédéric BECQ,	CNRS, Université de Poitiers
Rapporteur :	Pr. Jean-Luc VILOTTE,	INRA, Jouy-en-Josas
Examineur :	Dr. Christelle CORAUX,	INSERM, Reims
Examineur :	Dr. Alexandre HINZPETER,	INSERM, Paris
Directeur de thèse :	Dr. Mohamed BENHAROUGA,	UGA, Grenoble

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur le Docteur Jean-Jacques Feige d'avoir accepté de présider ma soutenance de thèse. Je remercie également Messieurs les Professeurs Jean-Luc Vilotte et Frédéric Becq de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de mon manuscrit de thèse. Merci également à Madame le Docteur Christelle Coraux et Monsieur le Docteur Alexandre Hinzpeter de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je remercie profondément l'association "Vaincre La Mucoviscidose" ainsi que tous ses membres et donateurs qui ont financé entièrement mes trois années de thèse. Sans eux, cela n'aurait pas été possible !

Je voudrais remercier du fond du cœur ceux sans qui je ne serai pas là, mes parents ! Merci Maman et merci Papa pour votre éducation, vos valeurs et tout ce que vous m'avez transmis. Vous m'avez toujours soutenu dans mes choix qui, parfois n'étaient pas les bons, mais qui m'ont permis de grandir et d'en arriver là aujourd'hui ! Je n'oublie pas non plus mes sœurs. Certes, nous sommes toutes les trois bien différentes mais c'est ça la famille, nan ?! En tout cas, merci à vous quatre, je vous aime !

Merci au Docteur Mohamed Benharouga d'avoir dirigé mes travaux de thèse et de m'avoir encadré pendant trois ans. Finalement, tu avais raison, c'est passé très vite et j'ai l'impression d'être arrivé au labo hier ! Je pourrai même te raconter avec précision ce lundi d'août 2016 quand je suis venu pour la première fois à Grenoble pour mon entretien ! Je garde et je garderai un très bon souvenir de ma thèse et de toute la gentillesse que tu as eu pour moi. J'en profite également pour remercier le Docteur Nadia Alfaidy. Merci pour tes conseils, tes dépannages de kit qPCR, ton aide à l'animalerie et tout ce que tu m'as apporté.

Je voudrais également remercier le Docteur et directeur du laboratoire Stéphane Ménage de m'avoir accueilli dans ces locaux. Merci pour la bonne humeur quotidienne que tu véhicules !

J'en viens maintenant à celles qui m'ont supportée chaque jour, pour le meilleur et pour le pire ! Celle qui jette mes tubes d'ICP à la poubelle, celles à qui j'ai

régulièrement fais la manche pour un café car je n'ai jamais de monnaie, celles qui m'ont fait mourir de rire lors de nos conversations "tupperware" dans le poulailler, celle qui a enrichi ma collection de Monsieur Madame, celle qui ... etc etc je pourrai encore en écrire des pages entières ... Bref, MERCI Peggy, Carole, Mireille, Jennifer et Adeline ! Nos pauses café vont terriblement me manquer !

Je n'oublie pas non plus les "anciens" doctorants ou post-doctorants du labo, Amel, Marianne, Jérôme, Xavier, Serge. Merci de m'avoir accueilli au tout début et de m'avoir fait découvrir Grenoble ! Bon maintenant c'est sûr je ne me mettrai jamais au ski, je ne pourrai jamais trahir ma côte Charentaise ! Serge, j'espère que tu ne finiras pas congelé au fin fond du Canada et Marianne fais gaffe tu as bientôt 30 ans !!

Steve, ne t'inquiète pas, c'est ton tour ! Je ne te remercierai jamais assez pour ton imagination ! Ton filleul Obama est aussi très reconnaissant ! Et merci pour tous les bons moments au labo et en dehors !

Enfin, je voudrais remercier tous les membres du labo et cela comprend le K et le K' ! Oui oui vous avez bien lu ! J'ai franchis la frontière et j'en suis ressorti vivante et surtout très contente d'avoir fait la connaissance de nombreuses belles personnes ! Merci pour tous ces repas partagés et les discussions du midi parfois houleuses, parfois complètement délirantes, mais toujours avec de la bonne humeur ! Alors merci à tous les membres des équipes BioCat, BioCE, AFFOND, SolHyCat, MCT et aussi et surtout BioMet, je ne vous oublierai pas et qui sait j'espère qu'on se reverra !

Enfin pour finir, c'est toujours lorsque l'on ne s'y attend pas que les bonnes choses arrivent. Tu es rentré dans ma vie au moment où j'en avais le plus besoin. C'est simple, tu as mis des paillettes dans ma vie et sans t'en rendre compte tu as su m'apporter tout le soutien dont j'avais besoin en fin de thèse. Alors merci Morgan d'être là et d'être toi !

Table des matières

Liste des abréviations	5
Table des figures	9
Introduction	15
Chapitre I : La mucoviscidose	17
I. Une maladie génétique des muqueuses	19
I.1. Histoire de la mucoviscidose	19
I.2. Epidémiologie	20
II. Du gène à la protéine CFTR.....	22
II.1. Le gène <i>CFTR</i>	22
II.2. Structure de la protéine CFTR	22
II.3. Biosynthèse et maturation	23
II.4. Dégradation	24
III. Fonctions biologiques de CFTR.....	25
III.1. Activité canal chlorure	25
III.2. Activité régulatrice.....	25
I.1.1. Les canaux ORCC.....	25
I.1.2. Les canaux ROMK.....	26
I.1.3. Les canaux ENaC.....	26
I.1.4. L'échangeur Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻	28
I.1.5. Les aquaporines.....	29
III.3. Rôle dans le trafic intracellulaire	29
I.1.6. Le complexe SNARE.....	29
I.1.7. La transcytose.....	30
III.4. Implication dans la réponse inflammatoire	32
III.5. Implication dans les infections respiratoires bactériennes	34
III.6. Rôle dans les jonctions cellulaires	35
IV. Mutation du gène <i>CFTR</i>	37
IV.1. Classification des mutations de CFTR	37
I.1.8. Mutations de classe I.....	37
I.1.9. Mutations de classe II.....	38
I.1.10. Mutations de classe III	39
I.1.11. Mutation de classe IV.....	39

I.1.12.	Mutations de classe V	39
I.1.13.	Mutations de classe VI.....	40
IV.2.	Modèles animaux pour l'étude de l'impact des mutations de <i>CFTR</i>	40
IV.3.	Thérapies moléculaires : Potentiators/correcteurs de <i>CFTR</i>	43
IV.4.	Description des atteintes cliniques	45
I.1.14.	L'atteinte génitale	46
I.1.15.	L'atteinte pancréatique et biliaire.....	47
I.1.16.	L'atteinte métabolique	47
I.1.17.	L'atteinte pulmonaire	48
Chapitre II : La barrière épithéliale bronchique	51
I.	Les épithéliums au sein des poumons	53
II.	Structure d'un épithélium bronchique sain	55
II.1.	Les cellules ciliées	55
II.2.	Les cellules sécrétrices.....	55
II.3.	Les cellules basales	56
III.	Rôle de barrière protectrice.....	56
III.1.	Clairance mucociliaire	56
III.2.	Jonctions cellulaires	57
III.2.1.	Les jonctions serrées	57
III.2.2.	Les jonctions adhérentes	60
III.2.3.	Les desmosomes	61
IV.	Cas de la mucoviscidose : perte de la barrière jonctionnelle bronchique	62
IV.1.	Augmentation de la viscosité du mucus, encombrement et perte de la clairance mucociliaire	62
IV.2.	Expression et activité des protéines jonctionnelles	63
Chapitre III : La protéine Prion cellulaire	67
I.	Histoire de la protéine PrP ^C	69
I.1.	Découverte des maladies à prions.....	69
I.2.	Identification de l'agent infectieux responsable de la transmission et de la propagation de la maladie : la protéine prion.....	70
II.	Pathogénicité de PrP ^C associée aux Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles.....	72
II.1.	Les différents types d'EST.....	72
II.1.1.	Les formes sporadiques.....	72
II.1.2.	Les formes génétiques.....	73

II.1.3. Les formes acquises ou par transmission infectieuse.....	75
II.2. Les traitements et perspectives thérapeutiques	76
III. Physiologie de PrP ^C	77
III.1. Le gène <i>PRNP</i>	77
III.2. Structure de la protéine PrP ^C	78
III.3. Synthèse, maturation, recyclage et dégradation	81
III.4. Expression et localisation.....	84
III.5. Régulation	84
IV. Fonctions de PrP ^C	87
IV.1. Rôle neuroprotecteur.....	87
IV.2. Relation avec les métaux.....	88
IV.3. Propriétés anti-oxydantes	91
IV.4. Localisation aux jonctions cellulaires	91
IV.5. Implication dans l'inflammation	93
IV.6. Implication dans les infections.....	95
V. Modèles animaux pour l'étude de PrP ^C	96
V.1. Génération de modèles murins génétiquement modifiés pour le gène <i>Prnp</i> ...97	
V.2. Impact de l'extinction et de la surexpression du gène <i>Prnp</i>99	
Objectifs	101
Résultats	107
I. Article 1 – Cellular prion protein (PrP ^C) is up regulated in cystic fibrosis : Role of CFTR protein.	109
I.1. Contexte de l'étude	110
I.2. Résultats.....	111
I.3. Conclusions.....	112
II. Article 2 – The cellular prion protein (PrP ^C) contributes to the acute <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lung infection in cystic fibrosis mice.	113
II.1. Contexte de l'étude	114
II.2. Résultats.....	115
II.3. Conclusions.....	116
Conclusions générales	117
Perspectives de thèse	123
Bibliographie	129
Annexes	155

Liste des abréviations

ABC	ATP-Binding Cassette
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AhR	Aryl hydrocarbon Receptor
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-Méthylisoazol-4-Propionate
AMPc	Adénosine Mono-Phosphate cyclique
Ap-1/2	Activator protein-1/2
AQ	Aquaporine
Arg	Arginine
ARM	motif Armadillo
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
Bax	Bcl-2-associated X
Bcl-3	B-cell lymphoma protein 3
Bcl-6	B-cell lymphoma protein 6
BPCO	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
CBAVD	Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens
CF	Cystic Fibrosis
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
Cl	Chlorure
Cl_A	Voie sécrétoire Alternative de Cl
c-myc	cellular-myc proto-oncogene
COX-2	Cyclo-OXygénase-2
Cu	Cuivre
deltaF508	Délétion de la phénylalanine en position 508
EGR4	Early Growth Response protein 4
ENaC	Epithelial sodium Channel
ERAD	Endoplasmic Reticulum-Associated protein Degradation
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
ESB	Encéphalopathie Spongiforme Bovine
EST	Encéphalopathie Spongiforme Transmissible
FI	Filament intermédiaire
GDP	Guanosine Di-Phosphate
GK	Guanylate Kinase
Gly	Glycine
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GMP	Guanosine Mono-Phosphate
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
grm8	Glutamate Receptor Metabotropic 8

GSS	syndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker
HCO₃	Bicarbonate
Hdj	Human DnaJ homologue
His	Histidine
HRPT	Hypoxanthine Phosphoribosyl-Transferase
HSE	Heat Shock sequence Elements
Hsp	Heat shock protein
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IFF	Insomnie Fatale Familiale
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IκB	Inhibitor of nuclear factor Kappa-B Kinase
IKK	IκB Kinase
IL	Interleukine
JAM	Junctional Adhesion Molecule
JNK	c-Jun N-terminal Kinases
loxP	locus of crossing-over from Phage
LPS	Lipopolysaccharide
MAGUK	Membrane-Associated-GUnylate Kinases
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MBC	Maladie de Bowel et de Crohn
MCJ	Maladie de Creutzfeldt Jakob
MEF-2	Myocyte Enhancer Factor-2
Met	Méthionine
MLS (HCCS)	HoloCytochrome C Synthase
Mn	Manganèse
MRE	Metal Responsive Element
MyoD	Myoblast Determination protein
MyT1	Myelin Transcription Factor 1
MZF-1	Myeloid Zinc Finger 1
Na	Sodium
NBD	Nucleotide Binding Domain
NEUROG1	Neurogenin-1
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF-IL6	Nuclear Factor for IL-6 expression
NFκB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGF	Nerve Growth Factor
NHERF	Sodium-Hydrogen Exchanger Regulatory Factor
Ni	Nickel
NLRP	NOD-Like Receptor family Pyrin domain
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate

Oct-1/2	Organic cation transporter-1/2
ORCC	Outwardly Rectifying Chloride Channel
ORF	Open Reading Frame
p38	p38 mitogen-activated protein kinase
p53	tumor protein 53
p65 = RelA	Transcription factor p65
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PDZ	<u>P</u> ost synaptic density protein, <u>D</u> rosophila tumor suppressor, <u>Z</u> onula occludens-1
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PI3K	Phospho-Inositide-3 Kinase
PK A/C	Protéine Kinase A/C
plcx3	Phosphatidylinositol Specific Phospholipase C X Domain Containing 3
PMR	Pattern Recognition Molecules
PNN	PolyNucléaire Neutrophile
PrP^C	Protéine prion cellulaire
PrP^{Sc}	Protéine prion Scrapie
RE	Réticulum Endoplasmique
Rho/ROCK	Rho-associated, Coiled-coil-containing protein Kinase
ROMK	Renal Outer Medullary potassium channel
ROS	Reactive Oxygen Species
RTE	Résistance Trans-Epithéliale
SAF	Scrapie-Associated-Fibrils
Sec61	Protein transport protein Sec61
SH3	Src Homology 3
SOD	SuperOxyde Dismutase
Sp-1	Specificity protein-1
SPR	Signal Particle Recognition
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
TcF/Lef	Transcription Factor / Lymphoid enhancer-binding factor
tga20	transgene insertion a20
TJP	Tight Junction Protein
TMD	TransMembrane Domain
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
Trp	Tryptophane
UTP	Uridine Tri-Phosphate
UV	Ultra-Violet
vMCJ	variante de la Maladie de Creutzfeldt Jakob
Wnt	Wingless
wt	wild-type

Zn	Zinc
ZNF238	Zinc Finger protein 238
ZO	Zonula Occludens

Table des figures

Figure 1 : Espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose depuis 1930. Graphique adapté à partir des données du registre de la fondation américaine pour la mucoviscidose (CF foundation, <https://www.cff.org/>).21

Figure 2 : Structure de la protéine CFTR. TMDs : TransMembrane Domain, NBD : Nucleotide Binding Domain, Domaine R : Régulateur.....23

Figure 3 : Modèle proposé pour la transcytose de CFTR dans les épithéliums des voies respiratoires. L'adressage basolatéral de CFTR se produit à partir d'endosomes apicaux (a1) et le long de la voie de biosynthèse (a2). (b) La protéine CFTR est endocytosé depuis la membrane basolatérale dans les endosomes de tri basolatéral. (c) La protéine CFTR issue des BSE est conditionnée dans des endosomes transcytotiques (TE) EEA1+ puis transportée au pôle apical par une voie dépendante des microtubules (MT). (d) L'internalisation basolatérale, le recyclage et la voie (e) transcytotique du récepteur de la transferrine (TfR) sont indiqués par des lignes pointillées afin de comparer le trafic de CFTR et TfR. ASE: endosome de tri apical; ARE: endosome de recyclage apical; BSE: endosome de tri basolatéral; CRE: endosome de recyclage commun; EV: vésicules endocytiques. D'après "Transcytosis maintains CFTR apical polarity in the face of constitutive and mutation-induced basolateral missorting". Bidaud-Meynard A. et al. J, Cell Science. 132-10. jcs226886 2019.32

Figure 4 : Classification des mutations de CFTR. Schéma adapté de "Progress in therapies for cystic fibrosis. De Boeck K. et Amaral M.D. Lancet Respir. Med. 4-8. p 662-674. 2016" et " Classification of CFTR mutation classes. Lima Marson F.A. Lancet Respir. Med. 4. e37. 2016".38

Figure 5 : Modèles murins existant pour l'étude de la protéine CFTR. Tableau adapté de "Cystic fibrosis mouse models. Guilbault C. Am J Respir Cell Mol Biol. 36-1. p 1-7. 2007", "Pathophysiology of Gene-Targeted Mouse Models for cystic fibrosis. Grubb B.R. and Boucher R.C. Physiological review. 79-1. p S193-S214.

1999" et "Un modèle murin mimant les manifestations pulmonaires de la mucoviscidose vient d'être mis au point. Sauty A et Aubert J-D. Revue des Maladies Respiratoires. 22. p 17-19. 2005".....41

Figure 6 : Résumé de résultats d'essais cliniques adaptés aux différentes mutations de CFTR. VEMS : Volume Expiratoire Maximum par Seconde. ND : Non Déterminé. Tableau adapté de "Cystic Fibrosis. Elborn J.S. Lancet. 388-10059. p 2519-2531. 2016".....43

Figure 7 : Apparition des symptômes cliniques de la mucoviscidose en fonction de l'âge. ABPA : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique. Tableau adapté de "Cystic Fibrosis. Elborn J.S. Lancet. 388-10059. p 2519-2531. 2016".....46

Figure 8 : Comparaison entre une bronche saine et une bronche atteinte de bronchectasie. Schéma adapté du "National Heart Lung and Blood Institute". ..48

Figure 9 : Structure générale des poumons humains.53

Figure 10 : Transition cellulaire depuis la trachée jusqu'aux alvéoles. D'après " Ganong's Review of medical physiology 25th Ed. Barret K.E. et al. 2015".54

Figure 11 : Localisation tissulaire des différentes cellules formant l'épithélium bronchique humain.....56

Figure 12 : Schéma de l'organisation des jonctions cellulaires entre deux cellules épithéliales.57

Figure 13 : Représentation schématique des jonctions serrées dans une cellule épithéliale. D'après "Temporal and regional intestinal changes in permeability, tight junction, and cytokine gene expression following ovariectomy-induced estrogen deficiency" Collins, F. L. et al. Physiological reports. 5-9. e13263. 2017.58

Figure 14 : Représentation schématique des jonctions adhérentes. D'après "Régulation génétique de l'adhérence intercellulaire : Ou comment les cadhérines sculptent la drosophile" Bécam, I. et Huynh, J.R. ipubli inserm MS num. 3, 2017.60

Figure 15 : Représentation schématique des jonctions desmosomes.62

Figure 16 : Schéma de la barrière jonctionnelle bronchique dans le cas de la mucoviscidose. PNN : Polynucléaire Neutrophile, ROS : Reactive Oxygen Species.64

Figure 17 : Mutations du gène *PRNP* associées aux différentes EST génétiques. GSS : Syndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, IFF : Insomnie Fatale Familiale, MCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob. Schéma adapté de "Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. Weissmann C. J.Biol.Chem. 274-1, p 3-6. 1999".75

Figure 18 : (A) Schéma et (B) vue tridimensionnelle de PrP^C. OR: Octarepeats regions. D'après " Determinants of the Prion Protein N-Terminus and Its Adducts with Copper Ions " Sánchez-López, C. et al. Structural. Int. J. Mol. Sci. 20-1. 2019.79

Figure 19 : Mécanismes proposés pour le développement des EST acquises et génétiques. SAF : Scrapie-Associated-Fibrils. Schéma adapté de "From prion diseases to prion-like propagation mechanisms of neurodegenerative diseases. Acquatella-Tran Van Ba I. et al. Int. J. Cell. Biol. 975832. 2013"80

Figure 20 : Structure simplifiée de la protéine PrP^C et des différents fragments obtenus après clivage. Schéma adapté de "Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. Taraboulos A. et al. J. cell biol. 129-1. p 121-132. 1995".83

Figure 21 : Positions des sites de régulation du gène *PRNP* (liste non exhaustive). Schéma adapté de "Regulation of prion protein expression : a potential site for therapeutic intervention in the transmissible spongiform encephalopathies. Haigh C. L. et Brown D. R. *IJBS* 2-4. p 315-323. 2006".85

Figure 22 : Représentation de la coopération entre les protéines PrP^C et AMPA pour le transport intracérébral du zinc. Schéma adapté de "Neuronal zinc regulation and the prion protein. Watt N.T. et al. *Prion* 7-3. p 203–208. 2013". 90

Figure 23 : Modèle proposé pour l'interaction de PrP^C et de la kinase Src au sein des desmosomes. PKG : Plakoglobine, PKP : Plakophiline, DP : Desmoplakine. Schéma adapté de "Roles of the cellular prion protein in the regulation of cell-cell junctions and barrier function. Petit C.S.V. et al. *Tissue Barriers* 1:2. e24377. 2013".92

Figure 24 : Stratégies génétiques utilisées pour invalider le gène *Prnp* par recombinaison homologue dans des modèles murins. Rectangles rouges : cadres de lecture ORF, rectangles blancs : régions non codantes, étiquettes jaunes ou roses : séquences insérées, lignes pointillées : régions supprimées. Schéma adapté de "Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. Rossi D. et al. *EMBO J.* 20-4. p 694-702. 2001".97

Figure 25 : Caractéristiques et expression de PrP^C dans les modèles murins de surexpression de *PRNP*. ND : Non Déterminé. Tableau adapté de " Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. Fischer M. et al. *EMBO J.* 15-6. p 1255-1264. 1996".98

Figure 26 : Effets de l'extinction ou de la surexpression de la protéine PrP^C dans des modèles murins.....99

Figure 27 : Schéma récapitulatif du rôle cellulaire de la protéine PrP^C dans la mucoviscidose.....121

Figure 28 : Schéma récapitulatif illustrant les conséquences pulmonaires de la dérégulation de PrP^C dans la mucoviscidose122

Introduction

Chapitre I : La mucoviscidose

I. Une maladie génétique des muqueuses

I.1.Histoire de la mucoviscidose

Historiquement, les premiers symptômes de la mucoviscidose ont été rapportés au 15^{ème} siècle avec un proverbe irlandais qui disait "Malheur à cet enfant dont le baiser sur le front a un goût salé, il est ensorcelé et va bientôt mourir". Les premières descriptions pathologiques de la maladie ont été réalisées au cours du 16 et 17^{ème} siècle où plusieurs médecins, après avoir autopsiés les corps de jeunes enfants morts prématurément, décrivent des atteintes pancréatiques ; notamment la présence d'un pancréas enflé, blanchâtre et cirrhosé. Par la suite, le suisse Nils Rosen von Rosenstein (1706-1773) rapporte les cas de douze enfants souffrant de diarrhées, de retards de croissance, d'asthénie et de gonflements des membres pour lesquels l'autopsie avait descélé un pancréas durci. Il qualifia alors cette pathologie de maladie du flux cœliaque.

Au 19^{ème} siècle, le pathologiste Carl von Rokitansky (1804-1878) ainsi que le pédiatre Alois Bednar (1816-1888) décrivent le cas d'un fœtus de 7 mois présentant une perforation de l'intestin grêle avec la présence de méconium dans le péritoine, puis le cas d'un nouveau-né décédé d'obstruction intestinale 6 jours après sa naissance. L'autopsie montra que l'intestin du nouveau-né était rempli de méconium visqueux et épais. Ce furent probablement les deux premiers cas atteints d'iléus méconiale. Cependant, les médecins s'interrogeaient sur le fait que certains enfants présentant les mêmes troubles intestinaux ne mourraient pas si jeunes.

Il faudra attendre le début du 20^{ème} siècle pour que le terme "fibrose kystique" (de l'anglais cystic fibrosis) soit employé par le pédiatre Guido Fanconi von Grebe dans un article paru en 1936. Il y décrit pour la première fois que l'insuffisance pancréatique et les problèmes respiratoires chroniques observés chez certains enfants sont liés (1). En 1938, une autre pédiatre, Dorothy Hansine Andersen, décrit les différences histologiques observées entre un pancréas atteint de la maladie cœliaque et un pancréas atteint de fibrose kystique pancréatique. Elle fait alors pour la première fois une distinction entre ces deux types d'altération du pancréas qui présentent pourtant, des symptômes similaires (2). Quelques années plus tard, le pédiatre pathologiste et père de l'oncologie pédiatrique Sidney Farber invente le terme "mucoviscidose" car il pense que la fibrose kystique n'est pas seulement un problème pancréatique mais qu'il s'agirait d'un trouble général de la production du

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

mucus (3). Par la suite, D. H. Andersen réalisa une étude sur les familles des patients atteints de mucoviscidose et elle en arriva à la conclusion qu'il s'agit d'une maladie génétique à transmission autosomique récessive (4).

En 1948, suite à une canicule new-yorkaise, Paul di Sant'Agnesse observe une forte concentration en sels dans la sueur des patients atteints de mucoviscidose et publiera ensuite un article démontrant les déséquilibres dans les concentrations en ions sodium et chlorure dans cette maladie (5).

En 1981, le groupe de Michael Knowles montre des dysfonctionnements de l'épithélium pulmonaire (6), ce qui conduit Paul Quinton, lui-même atteint de mucoviscidose, à s'intéresser aux problèmes liés aux glandes sudoripares. Il constata alors que l'imperméabilité des épithéliums aux ions chlorures (Cl^-) signifiait que cet ion ne pouvait pas être sécrété, pouvant ainsi expliquer l'augmentation de la viscosité du mucus au niveau des différents épithéliums présents dans les organes touchés par la mucoviscidose (7).

Puis en 1989, le gène muté responsable de la mucoviscidose fut identifié et nommé *CFTR* pour cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (8) suivi par la découverte de la première et principale mutation dans la mucoviscidose, la délétion de la phénylalanine en position 508 (deltaF508).

En 1990, l'équipe de Michael J. Welsh a été la première à corriger le défaut de sécrétion des ions chlorures par expression de la protéine CFTR sauvage dans les cellules épithéliales atteintes de la mucoviscidose et à identifier l'existence d'une relation de cause à effet entre les mutations du gène *CFTR* et les dysfonctionnements du transport des ions chlorures (9). L'équipe de Riordan a par la suite apporté la preuve que CFTR est un canal Cl^- activé par l'AMPc (Adénosine Mono-Phosphate cyclique) et possède une conductance de 9 picosiemens (10).

I.2.Epidémiologie

La mucoviscidose est une maladie génétique rare (1/2500) à transmission autosomique et récessive qui affecte principalement la population caucasienne (11),(12). Aux Etats-Unis, environ 30 000 personnes sont affectées par la mucoviscidose, 4000 au Canada et en Europe, un bébé sur 3000 naît avec la mucoviscidose. En France, le nombre de patients est estimé à 7000 (13). Une personne sur 30 est porteur sain du gène *CFTR* muté et peut donc transmettre un allèle muté à sa descendance.

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

La mucoviscidose affecte de manière égale les deux sexes et la population mucoviscidosique est principalement jeune (14). Néanmoins, les progrès scientifiques de ces dernières années en termes de diagnostic, de traitement, de prise en charge et de recherche fondamentale ont permis d'améliorer considérablement la qualité de vie des patients ainsi que leur espérance de vie. Cette dernière est passée de moins d'un an en 1938 à en moyenne 40 ans dans les années 2000 (15) (Figure 1). Ces chiffres sont en constante évolution et montrent également que les enfants atteints de mucoviscidose nés après 2000 auront une espérance de vie de 50 à 60 ans.

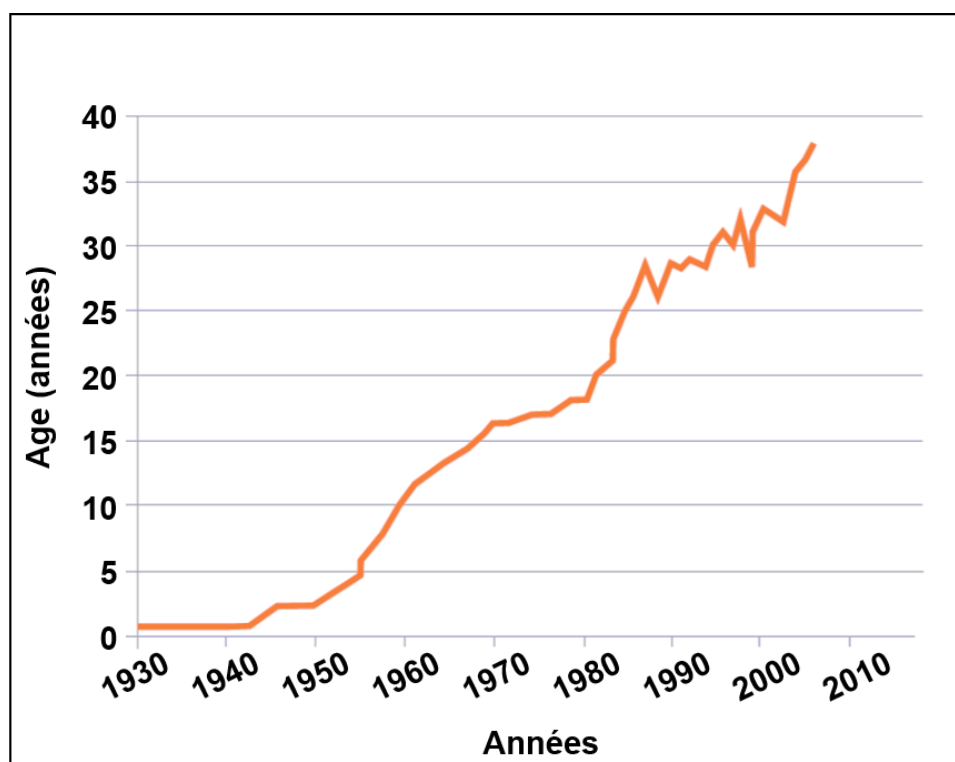


Figure 1 : Espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose depuis 1930. Graphique adapté à partir des données du registre de la fondation américaine pour la mucoviscidose (CF foundation, <https://www.cff.org/>).

Toutes ces données ont pu être obtenues grâce aux différents registres de patients mis en place dans plusieurs états. En France, l'association Vaincre La Mucoviscidose a créé en 1992 l'observatoire national de la mucoviscidose, maintenant appelé registre français de la mucoviscidose (RFM). Le développement de ces registres a permis une meilleure connaissance des paramètres médico-sociaux des patients atteints de mucoviscidose, des effets des traitements thérapeutiques ainsi que du coût engendré par les traitements.

II. Du gène à la protéine CFTR

II.1. Le gène *CFTR*

Le gène *CFTR* humain de 180kb se trouve sur le bras long du chromosome 7 en position 13 et est composé de 27 exons (Gene ID : 1080). Chez la souris, il est localisé sur le chromosome 6 en position 6 et contient aussi 27 exons (Gene ID : 12638). L'expression de *CFTR* est soumise à de fines régulations temporelles et tissulaires principalement contrôlées par des réarrangements chromatinien (16). En effet, des études ont permis de mettre en évidence des fluctuations de l'expression de *CFTR* au cours de la vie fœtale et également durant la vie adulte (17), avec notamment une nette diminution de l'abondance pulmonaire post-natale (18).

II.2. Structure de la protéine CFTR

L'ARNm (Acide RiboNucléique messenger) de 6,5 kb généré par le gène *CFTR* est traduit en 1480 acides aminés qui constituent la protéine CFTR. En 2017, l'équipe de Jue Chen a résolu la structure 3D de la protéine CFTR par cryomicroscopie électronique (19). CFTR est principalement exprimée au pôle apical des cellules épithéliales et des glandes exocrines. Les tissus épithéliaux, aussi appelés épithélium, tapissent de nombreux organes comme les poumons (20),(21), les intestins (22), le système reproducteur (23) et sont également présents au sein des glandes exocrines telles que le pancréas ou les glandes salivaires (24). La localisation de CFTR au niveau neuronal a également été montrée (25).

La protéine CFTR appartient à la superfamille des transporteurs transmembranaires ABC (ATP-Binding Cassette). Ce type de protéine est capable de fixer l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) pour l'hydrolyser et utiliser l'énergie libérée afin de transporter unidirectionnellement diverses substances de part et d'autre de la membrane plasmique. Parmi les nombreuses protéines ABC, la protéine CFTR est la seule à fonctionner comme un canal ionique (26). En effet, contrairement aux autres transporteurs de type ABC qui tirent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter les substrats contre leur gradient chimique tel un transport actif primaire ligand-dépendant, CFTR conduit les anions dans leur gradient électrochimique comme un transport actif secondaire grâce aux potentiels électrochimiques de la membrane.

La protéine CFTR est constituée de deux domaines transmembranaires hydrophobes TMDs (TransMembrane Domains) qui permettent la formation du canal au travers de la membrane pour le passage des ions. Elle possède aussi deux domaines cytoplasmiques de liaison à

l'ATP nommés NBD1 et NBD2 (Nucleotide Binding Domains). Ces domaines NBDs partagent trois séquences nucléotidiques très conservées caractéristiques de la superfamille des ABC: les motifs de Walker A et B (27) retrouvés chez de nombreuses protéines ayant une activité ATPasique et qui permet la liaison de l'ATP, ainsi que la séquence C ou motif signature des transporteurs ABC (LSGGQ) qui est très spécifique (Figure 2).

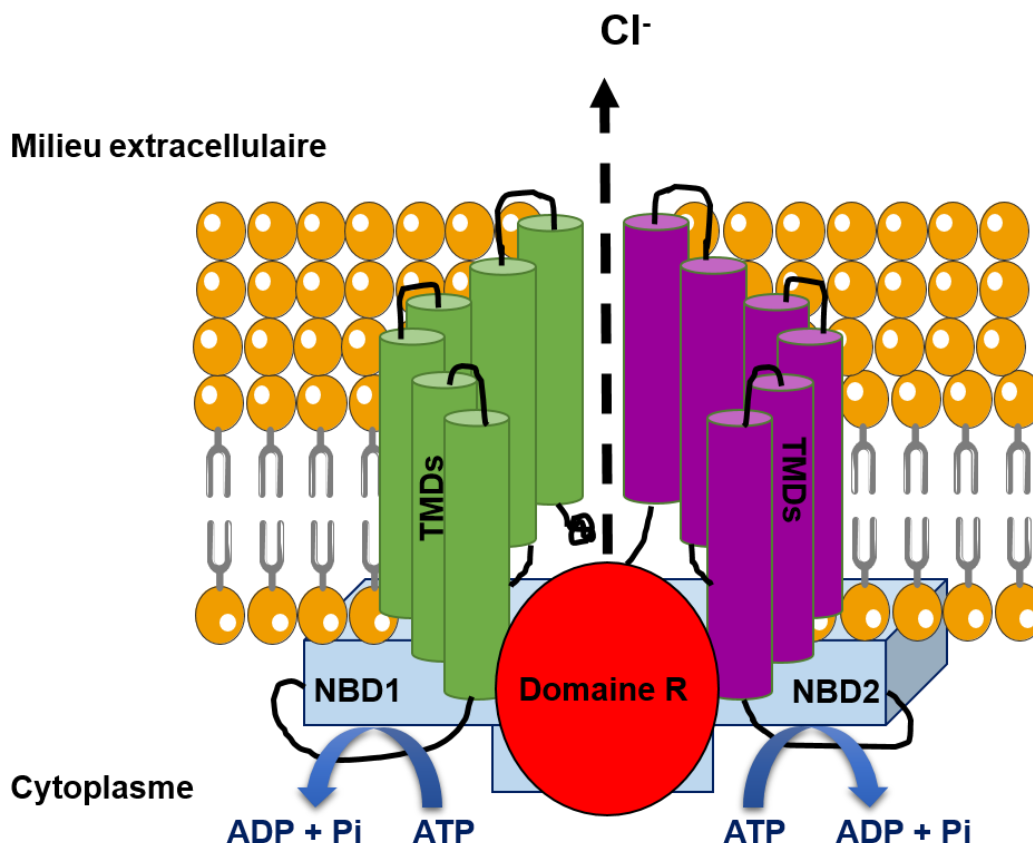


Figure 2 : Structure de la protéine CFTR. TMDs : TransMembrane Domain, NBD : Nucleotide Binding Domain, Domaine R : Régulateur.

Cependant, la protéine CFTR possède un domaine globulaire cytoplasmique supplémentaire, le domaine régulateur ou domaine R, qui comme son nom l'indique régule l'activité de CFTR. Ce domaine R est codé par un exon unique, le treizième. Il contient des sérines en position 660, 737, 795, et 813 qui doivent être phosphorylées par les protéines kinases A et C (PKA et PKC) dépendantes de l'AMPc et qui induisent un changement de conformation permettant l'ouverture du canal ionique CFTR (28).

II.3. Biosynthèse et maturation

La biosynthèse de CFTR, une glycoprotéine transmembranaire multi-domaines, s'effectue au niveau du réticulum endoplasmique (RE) dans trois compartiments distincts : la membrane du RE, la lumière du RE et le cytosol. En effet, la biogénèse de CFTR nécessite

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

le repliement coordonné de ces différents domaines protéiques. La génération de la chaîne polypeptidique de CFTR débute au niveau des ribosomes cytosoliques où elle est exportée vers la membrane du RE via le complexe de translocation Sec61 (Protein transport protein Sec61) grâce à sa séquence signal SPR (Signal Particle Recognition) et son récepteur SPR (29),(30),(31). Parallèlement à son insertion dans la membrane du RE, des groupements N-glycosylés sont ajoutés à la chaîne peptidique de CFTR, formant ainsi la forme core glycosylé ou bande B sensible à l'enzyme de deglycosylation ; endo H (H). Par la suite, les domaines TMDs et NBDs sont assemblés à la protéine CFTR naissante grâce à l'intervention de nombreuses protéines chaperonnes cytosoliques et lumenales telles que Hsp40, Hsp70, Hsp90 (Heat Shock protein) ou encore la calnexine (32),(31) assistées également par les co-chaperonnes Hdj-1 et Hdj-2 (Human DnaJ homologue 1 et 2) (33),(34). Enfin la protéine CFTR est exportée vers l'appareil de Golgi dans lequel sont apportées des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation du fragment glycane qui génère la forme mature et entièrement glycosylée de CFTR appelée bande C sensible à l'enzyme de deglycosylation endoF (F).

II.4.Dégradation

Lors de sa biosynthèse, si CFTR ne parvient pas à atteindre son repliement naturel et correct, les chaperonnes telles que Hsp70 agissent pour recruter les enzymes ubiquitine ligase E3 et/ou E4 qui vont finaliser le processus d'ubiquitination du CFTR qui sera pris en charge par le système de dégradation cytoplasmique ubiquitine-dépendant, le protéasome 26S (35). Lorsque les protéines CFTR présentes à la membrane apicale sont recyclées, elles sont alors endocytosées par les clathrines et transportées via des vésicules d'endocytose (36). La détection de CFTR au niveau des cavéolines n'a jamais été observée et leur inhibition ne modifie pas la quantité de CFTR à la membrane (37). Cependant, d'autres travaux ont suggéré que l'internalisation de CFTR par les cavéolines serait indispensable pour sa fonction de récepteur à *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Il a été proposé que la localisation de CFTR dans les domaines lipidiques raft de la membrane (membranaires riches en cholestérol en glycosphingolipides, en protéines G et en cavéolines) était un point essentiel pour la détection de PA et que le complexe CFTR-PA permettrait le déclenchement de l'internalisation par les cavéolines (38),(39).

III. Fonctions biologiques de CFTR

III.1. Activité canal chlorure

La protéine CFTR possède la fonction principale de canal anionique permettant le passage de différents anions tels que les ions chlorures (Cl^-) et les ions bicarbonates (HCO_3^-) au travers de la membrane plasmique. Ces ions participent à l'équilibre hydrique et au maintien d'un pH stable. Dès lors qu'il y a un déséquilibre ionique de part et d'autre de la membrane, différents paramètres physico-chimiques de l'environnement cellulaire tels que l'hydratation et la viscosité vont être modifiés.

Dans le cas de la mucoviscidose, les perturbations de l'activité canal chlorure vont conduire à une déshydratation du mucus au sein des différentes muqueuses de l'organisme. Le mucus devient visqueux, il ne circule pas ou peu et perd ses propriétés protectrices.

Cependant les dysfonctionnements de la protéine CFTR ne permettent pas d'expliquer l'ensemble des désordres ioniques. Il a donc été suggéré un rôle régulateur à la protéine CFTR permettant de contrôler l'activité d'autres canaux ioniques via notamment ses domaines de liaisons PDZ (Post synaptic density protein, Drosophila tumor suppressor, Zonula occludens-1) ([40](#)).

III.2. Activité régulatrice

I.1.1. Les canaux ORCC

Les canaux ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel) possèdent une fonction de canal chlorure permettant la sécrétion des ions Cl^- et sont régulés par l'AMPc. Toutefois, dans le contexte de la mucoviscidose, ces canaux sont inactifs et insensibles à la phosphorylation par les protéines kinases A et C ([41](#)). Cette observation suggère que l'activité de la protéine CFTR est nécessaire pour l'activation des canaux ORCC.

Des études plus approfondies ont confirmé la régulation d'ORCC par phosphorylation de CFTR via un mécanisme autocrine/paracrine permettant le relargage d'ATP dans le milieu extracellulaire. L'ATP ainsi libéré se fixe aux récepteurs purinergiques P2R et stimule l'activité d'ORCC ([42](#)). Néanmoins, le mécanisme d'export de l'ATP par CFTR n'est pas encore complètement établi.

Deux hypothèses ont été proposées selon lesquelles CFTR jouerait lui-même le rôle de canal sécréteur d'ATP ou contrôlerait la formation de vésicules remplies d'ATP.

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

D'un point de vue structural, il a été montré que les domaines NBD1 et R de CFTR sont essentiels pour l'activité régulatrice des canaux ORCC (42).

I.1.2. Les canaux ROMK

Les canaux potassiques ROMK (Renal Outer Medullary Potassium Channel) sont localisés au pôle apical des cellules rénales et participent au recyclage des ions K^+ . Des canaux potassiques similaires aux ROMK sont également présents dans les voies aériennes (43). Les canaux ROMK sont régulés notamment par le pH intracellulaire et l'ATP, qui sont deux facteurs étroitement liés à CFTR.

Ainsi des études suggèrent que la protéine CFTR est capable de réguler négativement l'activité des ROMK via le transport d'ATP intracellulaire. Cette inhibition est réalisée par l'intermédiaire du complexe protéique régulateur NHERF1/NHERF2 (Sodium-Hydrogen Exchanger Regulatory Factor 1/2) qui interagit avec les domaines PDZ de CFTR et ROMK (44). Tout comme pour la régulation d'ORCC, le contrôle de ROMK requière les domaines NBD1 et R de CFTR mais également le domaine TMD1 (45).

I.1.3. Les canaux ENaC

Dans la mucoviscidose, en absence de sécrétion d'ions Cl^- , le canal ENaC (Epithelial Sodium Channel) est hyperactivé par l'AMPc et entraîne l'absorption massive des ions Na^+ au pôle apical des cellules épithéliales. En absence de CFTR, l'AMPc et la PKA activent le canal ENaC. En revanche, lorsque les canaux CFTR et ENaC coexistent au sein d'une cellule, l'effet de l'AMPc sur le canal ENaC s'inverse. En effet, l'AMPc stimule préférentiellement le canal CFTR, qui lui-même inhibe l'activité d'ENaC. Ces phénomènes de régulation entre différents canaux illustrent la dynamique d'un épithélium à interchanger les mécanismes d'absorption et de sécrétion. Néanmoins, les bases moléculaires contrôlant l'inhibition d'ENaC restent méconnues. Plusieurs travaux ont été menés et alimentent diverses hypothèses :

Par homologie avec la régulation des canaux ioniques ORCC et ROMK, une étude a montré que la libération d'ATP ou d'UTP (Uridine Tri-Phosphate) serait responsable de l'inhibition du canal ENaC par activation des récepteurs purinergiques (46). Cependant, les mécanismes moléculaires sont toujours méconnus et le transport d'ATP par CFTR reste controversé. Ainsi, un an plus tard, les mêmes auteurs rapportent que leurs travaux ne permettent pas de confirmer que l'inhibition du canal ENaC est le résultat de la libération d'ATP induite par CFTR (47).

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

Une interaction biochimique directe interviendrait entre CFTR et ENaC et contrôlerait l'activité d'ENaC. En effet, les domaines NBD1 et R interagissent avec le domaine C-terminal d'ENaC et la délétion du domaine NBD1 abolit la régulation négative d'ENaC (48).

Une interaction indirecte liée au cytosquelette et au trafic intracellulaire interviendrait entre CFTR et ENaC et permettrait à CFTR d'agir sur la régulation d'ENaC. Il est possible d'envisager que l'actine pourrait être cet intermédiaire car il est connu que les canaux CFTR et ENaC sont perturbés par les interactions avec les protéines du cytosquelette (49) (50).

Cette dernière hypothèse semble plausible puisque des études réalisées sur l'épithélium du canal sudoripare ont montré que dans ce contexte épithélial, l'effet de CFTR sur ENaC est inversé et active la sécrétion de Na^+ (51). De plus, ni la phosphorylation ni l'AMPc ne sont nécessaires à l'activation d'ENaC. En revanche, un courant chlorure est essentiel pour cette activation (52). L'ensemble de ces données laisse penser que l'adressage et le trafic des protéines CFTR et ENaC via l'actine sont coordonnés, liés à la fonction canal Cl^- et dépendants du type de tissu épithélial.

D'autres études se sont intéressées aux gènes codant pour les trois sous-unités du canal ENaC : α , β et γ . La sensibilité et l'efficacité de l'activité du canal ENaC requiert l'ensemble de ces sous-unités (53).

Des mutations dans les gènes *SCNNIA* et *B*, qui codent les sous-unités α et β de la protéine ENaC, respectivement, ont été associées aux maladies pulmonaires similaires à la mucoviscidose en l'absence de mutations de CFTR (54). Lorsque *SCNNIA* est délété chez la souris, le transport du sodium et la clairance mucociliaire sont abolis. La délétion de *SCNNIB* ou *SCNNIG* (codant la sous-unité γ du canal ENaC), entraîne la mort par hyperkaliémie (55), ce qui suggère que la sous-unité α du canal ENaC pourrait être plus cruciale pour le bon fonctionnement du canal sodique dans les poumons.

A l'inverse, il a été montré que les mutations induisant une hypoactivité du canal ENaC provoquent un pseudohypoaldostéronisme (56) (57), ce qui étend la profondeur de l'ASL et accélère la vitesse de clairance mucociliaire.

Dès les années 2000, des chercheurs ont entrepris de comprendre le rôle de chacune des sous-unités du canal ENaC. Pour cela, ils ont développé des oligonucléotides anti-sens et

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

des ARN interférant (ARNi) ciblant *SCNNIA*, *SCNNIB* et *SCNNIG* (58) (59). Les oligonucléotides anti-sens ciblant *SCNNIA* ont entraîné une diminution de la densité membranaire apicale des canaux ENaC, et une réduction du courant et de la conductance. Concernant les ARNi dirigés contre *SCNNIB*, ils ont entraîné une réduction de l'activité de l'ENaC dans des cellules épithéliales bronchiques humaines, accompagné d'une diminution du niveau d'ARNm de l'ENaC et du sodium intracellulaire. Plus récemment, les travaux du groupe de Shuling Guo ont confirmé la diminution des sous-unités de l'ENaC induites par les oligonucléotides anti-sens *in vivo* sur des modèles murins mimant le phénotype de la mucoviscidose (60). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé le modèle transgénique de surexpression de la sous-unité β de l'ENaC qui entraîne une hyperabsorption de sodium ainsi qu'une déshydratation du mucus (61) et le modèle invalidé pour le gène *Nedd4-2* (Neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 4-like) codant une ubiquitine ligase responsable de la régulation négative de l'ENaC (62). Grâce à ces modèles, ils ont pu montrer que lorsque tous les niveaux des sous-unités de l'ENaC sont diminués, la viscosité du mucus et le recrutement de neutrophiles sont réduits et la fonction pulmonaire est améliorée.

I.1.4.L'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$

Les ions bicarbonates sont majoritairement présents dans les liquides de surface de l'organisme où ils agissent comme des tampons pour maintenir le pH intracellulaire. La protéine CFTR joue un rôle dans l'équilibre des ions bicarbonate en agissant comme un canal sécréteur de HCO_3^- (63) ou en s'associant à un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Dans la mucoviscidose, lorsque CFTR est inactive ou non adressée à la membrane plasmique, sa conductance pour les ions bicarbonates est inhibée ce qui engendre notamment des dysfonctionnements de l'alcalinisation des sucs pancréatiques, à l'origine des insuffisances pancréatiques observées chez les patients.

Pour pallier à ces perturbations de pH, il existe une régulation par des transporteurs ioniques tels que CFTR et l'échangeur anionique AE2. La régulation de l'AE2 est induite par la fixation du glucagon sur son récepteur entraînant une augmentation d'AMPc intracellulaire puis l'activation de la PKA et la stimulation d'AE2. L'activation d'AE2 permet ainsi l'entrée d'ions Cl^- dans la cellule et la sécrétion d'ions HCO_3^- . Par la suite le Cl^- importé dans la cellule est pris en charge par CFTR qui l'excrète afin de maintenir un gradient de Cl^- et l'activation d'AE2 (64).

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

I.1.5. Les aquaporines

Les aquaporines (AQs) sont des canaux transmembranaires permettant le passage bidirectionnel de l'eau à travers la membrane plasmique. Lorsque la protéine CFTR est mutée, les échanges d'eau effectués par les AQs entre le milieu extra- et intra-cellulaire sont désordonnés, suggérant un lien entre CFTR et les AQs. CFTR co-localise notamment avec les AQs 1 et 5 (65) où AQ1 co-localise également avec l'échangeur AE2. Il est également connu que l'AMPc, activateur de CFTR, coordonne le trafic de vésicules vers la membrane au sein desquelles se trouve CFTR, AQ1 et AE2 pour permettre la diffusion d'eau (64).

III.3. Rôle dans le trafic intracellulaire

L'adressage de la protéine CFTR représente une étape cellulaire cruciale puisque l'absence de CFTR à la membrane apicale implique un défaut de sécrétion de Cl⁻.

I.1.6. Le complexe SNARE

La régulation de l'adressage de CFTR implique les complexes multiprotéiques SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor) constitués notamment par les protéines syntaxin, vti1b (vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B) et VAMP (Vesicle-associated membrane protein). Les protéines SNARE sont des composants clés dans le trafic intracellulaire des cellules eucaryotes et sont impliquées dans les événements de fusion membranaire.

Au niveau neuronal, la syntaxine 1A est connue pour former un complexe avec les protéines SNAP-25 et VAMP-2 régulant l'exocytose à la membrane plasmique présynaptique (66). De manière intéressante, il a été montré que la syntaxine A1, accompagnée de SNAP-23, un homologue non neuronal de SNAP-25, interagit également avec la partie N-terminale de CFTR et inhibe le courant Cl⁻ médié par CFTR (67) (68). En effet, la liaison de la syntaxine A1 à l'extrémité N-terminal de CFTR empêche son interaction avec le domaine R et/ou NBD1. Toutefois, le résidu essentiel à l'interaction spécifique entre CFTR et la syntaxine A1 a pu être identifié, il s'agit d'un acide aminé hydrophile localisé dans le domaine H3 (69).

Une autre protéine du complexe SNARE, la syntaxine 8 impliquée dans le trafic des endosomes précoces aux endosomes tardifs, est connue pour interagir avec CFTR (70). La surexpression de la syntaxine 8 inhibe l'activité canal Cl⁻ de CFTR ainsi que son export vers la membrane plasmique. De plus, les protéines syntaxine 8 et CFTR co-localisent dans

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

des endosomes de recyclage Rab11 (Ras-related protein Rab-11), mais l'interaction entre les deux protéines reste faible et suggère l'existence d'une protéine intermédiaire dans cette interaction (71).

La protéine Csp (Cystein string protein) est connue pour interagir et réguler les complexes SNARE comme la syntaxine 1A, 4 ou VAMP. De plus, les protéines Csp et CFTR interagissent physiquement et fonctionnellement (72). Ainsi, Csp pourrait faire le lien entre les protéines SNARE et CFTR et apporter un nouveau mécanisme de régulation en couplant l'activation du canal CFTR avec son transport dans le trafic intracellulaire.

I.1.7. La transcytose

La transcytose est un type de transport transcellulaire dans lequel diverses molécules et protéines subissent un transport intracellulaire. Les molécules transcytosées sont tout d'abord endocytosées dans des vésicules depuis un pôle cellulaire, puis entraînées à travers la cellule et exocytosées à un autre pôle de la cellule. Le phénomène de transcytose est fréquent dans les cellules épithéliales.

Quatre voies de transport vésiculaires sont reconnues comme des événements importants dans l'expression basale de CFTR à la membrane plasmique : la sécrétion biosynthétique, l'internalisation constitutive lente, le recyclage, ainsi que la dégradation qui comprend les endolysosomes et les autophagosomes (73) (74) (75). Compte tenu de la longue demi-vie cellulaire et membranaire du CFTR dans les épithéliums (76) (77), il est essentiel de conserver un taux d'internalisation lent et un recyclage apical fidèle afin de maintenir la fonction chlorure de CFTR en minimisant sa dégradation prématurée et son mauvais adressage basolatéral.

Dans les épithéliums polarisés, les protéines membranaires apicales et basolatérales se répartissent respectivement entre les endosomes de tri apical (ASE Apical Sorting Endosome), de recyclage apical (ARE Apical Recycling Endosome), de tri basolatéral (BSE Basolateral Sorting Endosome) et de recyclage commun (CRE Commun Recycling Endosome) (78). Il a été montré que dans les cellules des voies respiratoires, le CFTR internalisé apicalement, est capturé par les endosomes ASE-EEA1+ (Early Endosome-Associated protein-1) et est recyclé via les endosomes ARE-Rab11+ (79) (80) de manière dépendante de la PKA (81). Cependant, les mécanismes moléculaires de la dégradation rapide de la protéine CFTR correctement conformée mais adressée de manière basolatérale n'est pas connue. Toutefois, il a été montré que i) l'adressage forcé de CFTR vers la

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

membrane plasmique basolatérale abolit sa fonction de sécrétion anionique transépithéliale (82) et ii) en l'absence de transcytose apicale, l'accumulation basolatérale de CFTR réduit l'entrée de Cl⁻ basolatérale, provoquant une atténuation de la sécrétion d'eau et de la clairance mucociliaire des épithéliums des voies respiratoires (83).

Très récemment, le groupe de Lukacs a montré que la transcytose apicale et basolatérale représente des voies de trafic membranaire, auparavant non reconnues, contribuant significativement au développement et au maintien de la polarité apicale de CFTR (84). Les auteurs ont montré que la transcytose apicale du CFTR et l'internalisation basolatérale jouent conjointement un rôle dans la neutralisation du mauvais adressage basolatéral constitutif du canal CFTR. En effet, ces deux phénomènes maintiennent une quantité de CFTR environ 30 fois plus élevée au niveau apical que basolatéral dans les cellules épithéliales. Ils ont montré que la suppression des motifs PDZ n'a pas ou peu d'influence sur l'expression apicale, l'activité de transport et la stabilité du CFTR. Néanmoins, la perte du domaine PDZ induit une augmentation de l'internalisation basolatérale de CFTR et du flux de transcytose apicale. Ainsi, ce groupe a proposé un modèle de trafic intracellulaire physiologique de CFTR dans les cellules épithéliales des voies aériennes faisant intervenir la transcytose apicale et basolatérale via les endosomes de tri apical (ASE) et basolatérale (BSE), les endosomes de recyclage apical (ARE) et les microtubules (Figure 3).

Il est donc tout à fait possible d'imaginer que dans la mucoviscidose, les phénomènes de transcytose de CFTR soient perturbés ou inhibés et ne parviennent pas à maintenir un taux suffisant de CFTR fonctionnel à la membrane apicale. On peut aussi spéculer sur l'existence de partenaires protéiques de CFTR pour son trafic intracellulaire.

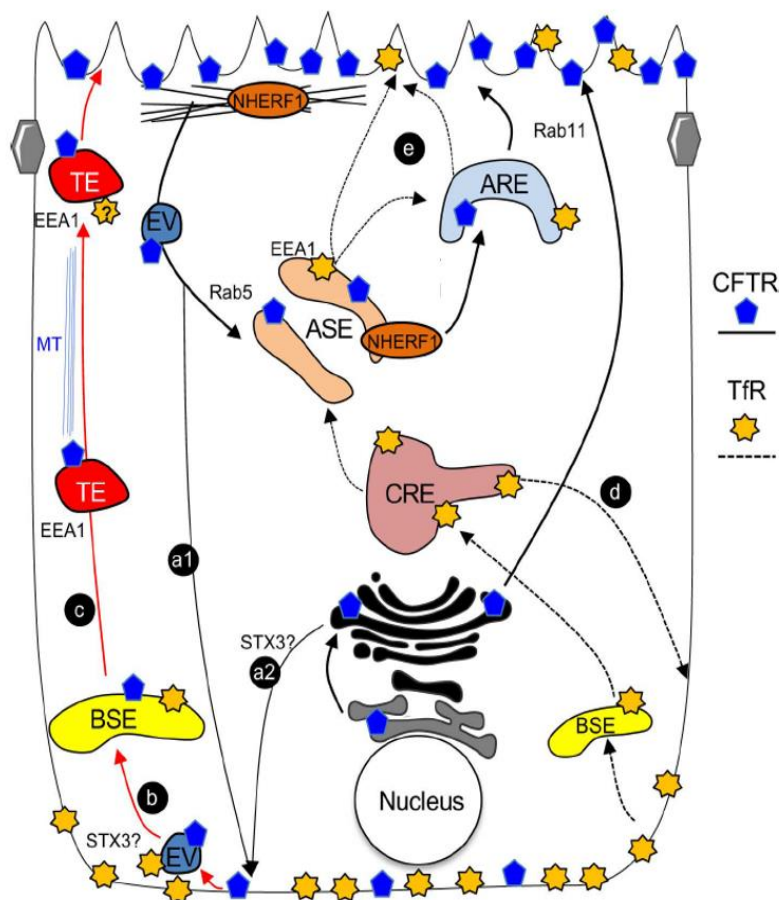


Figure 3 : Modèle proposé pour la transcytose de CFTR dans les épithéliums des voies respiratoires. L'adressage basolatéral de CFTR se produit à partir d'endosomes apicaux (a1) et le long de la voie de biosynthèse (a2). (b) La protéine CFTR est endocytosée depuis la membrane basolatérale dans les endosomes de tri basolatéral. (c) La protéine CFTR issue des BSE est conditionnée dans des endosomes transcytotiques (TE) EEA1+ puis transportée au pôle apical par une voie dépendante des microtubules (MT). (d) L'internalisation basolatérale, le recyclage et la voie (e) transcytotique du récepteur de la transferrine (TfR) sont indiqués par des lignes pointillées afin de comparer le trafic de CFTR et TfR. ASE: endosome de tri apical; ARE: endosome de recyclage apical; BSE: endosome de tri basolatéral; CRE: endosome de recyclage commun; EV: vésicules endocytiques. D'après "Transcytosis maintains CFTR apical polarity in the face of constitutive and mutation-induced basolateral missorting". Bidaud-Meynard A. et al. J, Cell Science. 132-10. jcs226886 2019.

III.4. Implication dans la réponse inflammatoire

L'implication de CFTR dans la réponse inflammatoire dans le cas de la mucoviscidose est toujours un sujet très controversé. En effet, l'inflammation observée chez les patients ne serait que la conséquence des infections bactériennes persistantes. De plus, les thérapies

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

existantes comme l'Orkambi© (prescrite chez les patients homozygotes pour la mutation deltaF508) qui corrige et potentialise CFTR à la membrane plasmique n'ont pas d'effet sur l'état inflammatoire des patients.

Néanmoins, les données actuelles issues de jeunes patients dépourvus de primo-infection ainsi que celles obtenues sur des cultures cellulaires primaires stériles contredisent ce dogme (85),(86) et suggèrent que l'origine de cette inflammation n'est pas infectieuse mais moléculaire, en lien avec CFTR qui possède de nombreuses fonctions physiologiques.

A ce jour, les études portant sur l'origine de l'inflammation se sont surtout focalisées sur la voie de signalisation NFκB (Nuclear Factor Kappa light chain enhancer of activated B cells). En effet, l'activation de la voie NFκB induit une forte sécrétion d'interleukine 8 (IL-8) qui elle-même entraîne l'afflux massif de polynucléaires neutrophiles par son effet chimio-attractant : deux caractéristiques largement présentes chez les patients atteints de mucoviscidose (87),(88).

Dans le cas de la mutation deltaF508, la voie NFκB est continuellement activée ce qui conduit à un état inflammatoire chronique des voies respiratoires (89).

Une première hypothèse suggère que la protéine CFTR aurait un rôle de récepteur PMR (Pattern Recognition Molecules) aux motifs spécifiques des pathogènes appelés PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) comme le LPS (Lipopolysaccharide) des bactéries Gram négatif. Les travaux de ce groupe ont montré que le LPS de PA est spécifiquement reconnu et fixé par la protéine CFTR wild-type (wt) et que cette fixation entraîne l'extraction du LPS à la surface de la bactérie. Puis le LPS est endocyté par les cellules épithéliales qui vont rapidement induire la translocation et l'activation de la voie NFκB (90). Cependant les résultats obtenus dans des cellules bronchiques humaines CFTR-deltaF508 et des souris transgéniques CFTR-deltaF508 montrent une incapacité d'internaliser le LPS de PA alors que la mutation deltaF508 induit une inflammation par le NFκB. Cela suggère d'une part que l'endocytose du LPS nécessite un CFTR fonctionnel et d'autre part que l'activation de la voie NFκB est régulée par d'autres mécanismes cellulaires.

Une seconde hypothèse, à l'opposé de la première, suggère un rôle de CFTR dans la régulation négative de la voie NFκB, via la phosphorylation de la protéine IκBα (Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells, alpha), un inhibiteur du NFκB (91).

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

Dans cette étude, les auteurs ont co-exprimé *in vitro* de manière transitoire les promoteurs de CFTR-wt et IL-8 ou CFTR-wt et NFκB couplés à la luciférase. Ils ont observé que l'expression de CFTR-wt supprime les activités des promoteurs de l'IL-8 et du NFκB. Cette observation a été confirmée dans les cellules épithéliales CFTR-deltaF508 transfectées transitoirement avec le CFTR-wt et également *in vivo* chez des souris CFTR^{-/-} après une infection au LPS de PA (91). Ainsi ces auteurs ont suggéré que CFTR est un régulateur négatif de la réponse immunitaire innée médiée par NFκB. Cependant, cette hypothèse semble peu probable puisque la surexpression stable de CFTR-wt dans des cellules épithéliales CFTR-deltaF508 ne permet pas de corriger l'hyperactivation de NFκB. Ceci laisse penser que d'autres acteurs participent, en coopération ou non avec CFTR, à l'activation de NFκB et que la correction par le CFTR-wt à elle seule ne suffit pas pour réguler la voie NFκB.

III.5. Implication dans les infections respiratoires bactériennes

Les patients atteints de mucoviscidose présentent une sensibilité accrue aux infections respiratoires et leurs voies aériennes sont chroniquement infectées. En effet, dans le liquide broncho-alvéolaire de jeunes enfants, des pathogènes tels que *Staphylococcus aureus* ou *Haemophilus influenza* sont détectés très rapidement. Puis dans des stades plus tardifs de la maladie, les poumons des patients sont chroniquement colonisés par *Pseudomonas aeruginosa*.

Les isolats de PA provenant de patients présentent fréquemment des mutations d'adaptation à l'hôte, y compris dans le gène *LasR*. Le gène *LasR* est le principal régulateur transcriptionnel du quorum sensing, un système de communication bactérien permettant une expression génique coordonnée. L'exposition des voies aériennes à PA et/ou aux exoproduits qu'elle sécrète a été associée à une perte d'intégrité épithéliale *in vitro*, à des lésions tissulaires progressives et à une dégradation de la fonction pulmonaire *in vivo* (92) (93) (94). Durant ces dernières années, le groupe d'Emmanuelle Brochiero a montré que les exoproduits sous le contrôle de LasR altéraient la réparation épithéliale des voies respiratoires après une blessure (95) et que l'inhibiteur de quorum sensing HDMF (4-hydroxy-2,5-diméthyl-3 (2H) –furanone) supprime l'effet délétère de PA sur la réparation des épithéliums respiratoires.

En plus des effets néfastes sur l'intégrité des voies respiratoires, les infections à PA ont également une incidence sur l'expression et la fonction de CFTR. Plusieurs études ont

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

montré que l'exposition à des souches ou à des exoproduits de PA réduisait l'expression de CFTR-wt et la sécrétion de Cl⁻ au niveau de la membrane apicale (96) (97) (98). Cependant, les mécanismes par lesquels PA modifie CFTR semblent complexes et restent inconnus. Certaines données indiquent que l'exposition aux exoproduits de PA réduit la synthèse de la protéine CFTR et augmente sa dégradation (98). D'autres résultats montrent que l'élastase contrôlée par le régulateur de quorum sensing LasB régule négativement les niveaux d'expression de CFTR (99) et que l'ubiquitination et la dégradation accrue de CFTR serait en partie dues au facteur Cif, un inhibiteur de CFTR présent dans les vésicules de la membrane externe de PA (100). Il a été proposé que l'inhibition du recyclage endocyttaire de CFTR pourrait également être médiée par un mécanisme dépendant du NHERF (97).

Enfin, il a été montré que la barrière épithéliale jonctionnelle bronchique est également affectée dans la mucoviscidose et participe aux processus d'inflammation chronique. Dans ce contexte inflammatoire, les cellules épithéliales bronchiques subissent un remodelage et deviennent sécrétrices de médiateurs pro-inflammatoires. De plus, l'expression et l'activité des protéines formant les jonctions cellulaires sont perturbées. Le domaine PDZ de la protéine CFTR peut interagir avec certaines protéines des jonctions cellulaires et pourrait via l'actine participer au maintien de la barrière jonctionnelle bronchique.

III.6. Rôle dans les jonctions cellulaires

Au sein de l'épithélium bronchique, la cohésion des cellules épithéliales est essentielle pour garantir une barrière physique étanche et solide. Pour assurer cela, les cellules épithéliales sont capables de former des complexes jonctionnels protéiques entre elles (ces complexes jonctionnels protéiques sont décrits dans le chapitre II – La barrière épithéliale bronchique).

Dans le cas de la mucoviscidose, les mutations du gène *CFTR* entraînent des dysfonctionnements de la barrière jonctionnelle bronchique qui n'assure plus ses fonctions protectrices. Ce phénomène se caractérise par la perte de l'intégrité de l'épithélium pulmonaire. Dans les tissus épithéliaux exprimant la protéine CFTR-deltaF508, la Résistance Trans-Épithéliale (RTE) est drastiquement diminuée (101) tandis qu'une augmentation de la perméabilité au mannitol est observée. De manière intéressante, lorsque la mutation deltaF508 est corrigée *in vitro* par l'expression de la protéine CFTR sauvage, la RTE est rétablie et la perméabilité au mannitol diminue. Ces phénomènes seraient liés à la voie de signalisation Rho/ROCK (Rho-associated, Coiled-coil Containing Protein

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

Kinase). En effet, l'activation de CFTR entraîne une dépolarisation de la membrane plasmique. Celle-ci active la voie Rho/ROCK dans le but d'induire la phosphorylation des chaînes de myosine et ainsi augmenter la perméabilité paracellulaire (102). Dans la mucoviscidose où la protéine CFTR est absente, il a été proposé que l'hyperactivation du canal ENaC est à l'origine de la dépolarisation de la membrane, qui devient perméable.

Dans les cellules épithéliales polarisées, la protéine CFTR se lie à l'actine cytoplasmique par l'intermédiaire des domaines protéiques PDZ et de la protéine ezrine (40). La protéine ezrine permet de faire le lien entre la membrane plasmique et le cytosquelette. Au sein de ces interactions, les réactions de phosphorylation sont primordiales pour l'activation et la régulation des liaisons. Il a été montré que CFTR est nécessaire pour la régulation normale de la perméabilité des jonctions communicantes par l'intermédiaire du TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha). Cet effet est médié par l'activité de la tyrosine kinase c-Yes, appartenant à la familles des kinases Src (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase) et par le recrutement de CFTR dans les domaines de la membrane résistants aux détergents (103) (104). L'inhibition de la phosphorylation par la SFK c-Yes peut altérer la formation des jonctions serrées en empêchant leur association (105). De plus, l'association de NHERF1 (une protéine apicale du cytosquelette de la famille des ezrines) avec la SFK c-Yes a également été montrée (106).

La liaison du domaine PDZ immobilise CFTR et lui permet d'interagir avec d'autres composants du complexe macromoléculaire apical (101). Ces interactions, ainsi que d'autres types d'interactions, pourraient permettre à CFTR d'interagir avec des protéines étroitement associées aux jonctions serrées, telles que la protéine Zonula Occludens (ZO) (107) ou des protéines régulatrices contrôlant l'assemblage de complexes jonctionnels (108). La génistéine, inhibiteur des tyrosines kinases, modifie les effets de CFTR et perturbe l'organisation de la barrière jonctionnelle, ce qui confirme l'implication de la phosphorylation par des tyrosines kinases telles que SFK c-Yes (105) ou SFK c-Src (109), qui peuvent toutes deux s'associer à CFTR via NHERF-1 (110). La délocalisation de CFTR-deltaF508 peut empêcher l'assemblage de tels complexes et la formation de jonctions serrées normales ; soit directement par la phosphorylation de la tyrosine d'éléments structurels du complexe, tels que la protéine occludine (105), ou indirectement par l'absence de phosphorylation de la protéine Par-3 (Partioning defective 3) (111). Par-3 est impliquée dans les processus cellulaires de polarisation et semble jouer un rôle central dans la formation des jonctions serrées au sein des épithéliums.

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

Ces observations défendent l'implication de la protéine CFTR dans le contrôle et l'organisation des complexes jonctionnels en association avec le cytosquelette des cellules et les mécanismes de polarisation au sein des tissus épithéliaux. Néanmoins, les bases moléculaires et les interactions précises permettant à la protéine CFTR d'exercer ses effets restent inconnues.

IV. Mutation du gène *CFTR*

IV.1. Classification des mutations de *CFTR*

De nos jours, pas moins de 2000 mutations du gène *CFTR* ont été identifiées avec un degré de sévérité variable. Ces mutations ont été classées en fonction du comportement biologique de la protéine CFTR. La première classification des mutations de *CFTR* fut proposée en 1993 par Welsh et Smith. Cette classification a tout d'abord permis de grouper les mutations en quatre catégories selon le défaut de la protéine CFTR ; i) défauts de synthèse, ii) défauts de maturation et de repliement, iii) défauts de régulation de l'ouverture du canal CFTR et iv) défauts de conduction des ions Cl⁻ ([112](#)).

La classification actuelle a été établie en se basant sur la première classification de Welsh et Smith mais dénombre aujourd'hui six groupes de mutations (Figure 4) :

I.1.8. Mutations de classe I

Ces mutations conduisent à une absence partielle ou totale d'expression de la protéine CFTR à la surface membranaire des cellules. Au niveau moléculaire, ces mutations sont dues à la substitution d'un ou plusieurs nucléotides introduisant ainsi un codon stop prématuré, des insertions ou des délétions. Ces mutations entraînent un décalage du cadre de lecture ou des anomalies d'épissage aboutissant soit au saut complet d'un exon, soit à une délétion importante du gène *CFTR* ou encore à un réarrangement génétique dans le gène *CFTR* qui modifie la séquence d'un exon ([113](#)). Ces mutations sont retrouvées chez 5 à 10% des patients atteints de mucoviscidose dans le monde avec notamment les mutations Trp1282X et Gly542X. Le X indique le codon stop qui remplace l'acide aminé.

Aspect global de la maladie	Très sévère						Moins sévère					
	Traitements (approuvés)		Correcteurs VX-809 (oui) (ou) Potentiateurs VX-770 (oui)		Potentiateurs VX-770 (non)		Oligonucleotides anti-sens (non) Stabilisateurs (non)					
Fréquence	5-10%		70%		1-2%		2-4%		<1%		<1%	
Thérapies	Correction de la synthèse protéique		Correction du trafic protéique		Restaurer l'activité canal chlorure		Restaurer l'activité canal chlorure		Correction de l'épissage de l'ARNm		Restaurer la stabilité protéique	
Exemples de mutations	Gly542X, Trp1282X		Phe508del, Asn1303Lys		Gly551Aasp, Ser549Arg		Arg117His, Ala455Glu		3272-26A→G		C.120del123	
Défaut de CFTR	Absence partielle ou totale d'expression de CFTR		Pas de trafic intracellulaire dû à un mauvais repliement de CFTR		Défaut d'ouverture du canal CFTR		Défaut de conductance du canal CFTR		Diminution de la quantité de CFTR à la membrane		Défaut de stabilité de CFTR	
Classification	Classe I		Classe II		Classe III		Classe IV		Classe V		Classe VI	

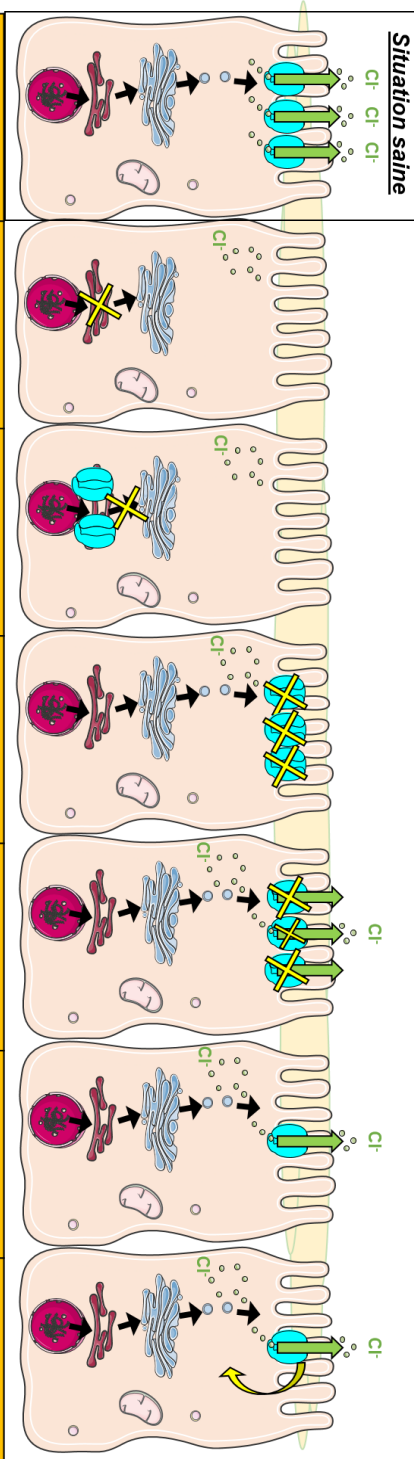


Figure 4 : Classification des mutations de CFTR. Schéma adapté de "Progress in therapies for cystic fibrosis. De Boeck K. et Amaral M.D. Lancet Respir. Med. 4-8. p 662-674. 2016" et " Classification of CFTR mutation classes. Lima Marson F.A. Lancet Respir. Med. 4. e37. 2016".

I.1.9. Mutations de classe II

Ces mutations sont à l'origine du trafic intracellulaire anormal de la protéine CFTR, notamment en raison de repliement incorrect. Ces mutations, qui peuvent être retrouvées

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

dans n'importe quel domaine de la protéine CFTR, entraînent la séquestration et la dégradation rapide de la protéine dans le RE. En effet, la conformation anormale de CFTR est détectée par le système de contrôle qualité du RE (ERQC ; endoplasmic reticulum quality control) qui cible la protéine vers les voies de dégradation dépendante (114),(115) et indépendante (116) du système ubiquitine/protéasome. Selon les mutations de classe II, ces altérations de l'adressage intracellulaire de la protéine CFTR entraînent sa diminution voire son absence totale à la surface des cellules. La mutation la plus fréquente (environ 70% des mutations identifiées) correspond à la délétion de la phénylalanine en position 508 de la protéine CFTR (deltaF508). (117).

I.1.10.Mutations de classe III

Ces mutations perturbent la régulation de l'activité canal chlorure de la protéine CFTR. Ce sont souvent des mutations faux-sens (substitution nucléotidique) localisées au niveau des domaines de liaison de l'ATP ; NBD1 et NBD2. La synthèse de la protéine CFTR s'effectue normalement et celle-ci s'insère correctement dans la membrane. Les mutations des domaines NBDs sont responsables de la diminution de la probabilité d'ouverture de l'activité canal chlorure du CFTR car elles réduisent le niveau de phosphorylation de CFTR. En effet, il a été montré que dans le cas de la mutation Gly551Asp (G551D), la probabilité d'ouverture du canal CFTR est environ cent fois inférieure à celle du canal CFTR sauvage (118). Selon les registres de patients, environ 4% à 5% des patients atteints de mucoviscidose sont porteurs de la mutation (G551D) sur au moins un allèle (119).

I.1.11.Mutation de classe IV

Ces mutations altèrent la conductance du canal CFTR et sont principalement localisées dans les TMDs impliqués dans la formation du canal. Ces mutations faux-sens produisent une protéine correctement insérée dans la membrane, qui conserve une activité canal Cl⁻ dépendante de l'AMPc, mais avec une conductance réduite. La mutation de classe IV la plus répandue est la mutation Arg117His (R117H), qui est retrouvée chez 2 à 4% des patients. (120)

I.1.12.Mutations de classe V

Ces mutations plus rares, approximativement 1%, déstabilisent les ARNm de CFTR. Le système d'épissage des ARNm est altéré, ce qui entraîne la génération d'ARNm épissés de manière aberrante et conduit à une diminution de la quantité de protéines CFTR à la membrane cellulaire. Néanmoins, les systèmes d'épissage affectés par ce genre de

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

mutations continuent de générer également un pool d'ARNm épissés correctement ce qui permet d'éviter une absence totale de protéine CFTR fonctionnelle à la membrane ([121](#)),([122](#)).

I.1.13. Mutations de classe VI

Ces mutations sont souvent associées aux mutations de classe V puisqu'elles affectent également la stabilité de CFTR mais au niveau protéique. Ces mutations provoquent une troncation de l'extrémité C-terminale de la protéine CFTR, qui n'est cependant pas indispensable pour la biosynthèse et la fonction de canal chlorure de CFTR. En revanche, cette extrémité C-terminale semble jouer un rôle crucial dans la stabilité de la protéine CFTR mature ([123](#)). De plus, il a été montré que l'absence de l'extrémité C-terminale modifie les paramètres d'endocytose de CFTR qui de ce fait est dégradée prématurément. En effet, l'augmentation du taux d'endocytose entraîne la réduction d'environ 50% de la protéine CFTR dans la membrane plasmique ([124](#)).

De manière générale, les mutations de classe I, II et III sont associées à un phénotype sévère de la maladie tandis que les mutations de classe IV, V et VI sont accompagnées de symptômes moins sévères, avec un phénotype dit intermédiaire.

IV.2. Modèles animaux pour l'étude de l'impact des mutations de *CFTR*

Afin d'étudier les processus physiopathologiques de la mucoviscidose et de comprendre les rôles multiples de CFTR, de nombreux modèles animaux ont été développés. Cependant, le modèle murin reste le plus utilisé et a été largement développé puisque l'homologie entre le gène *CFTR* humain et murin est de 78% et que la mutation deltaF508 se situe à la même position sur le gène murin ([125](#)).

Néanmoins, il est admis que ces modèles murins ne représentent pas fidèlement le phénotype de la mucoviscidose car ils ne présentent pas ou peu de symptômes pulmonaires de la mucoviscidose. En revanche, ces modèles permettent d'étudier les effets de l'extinction ou des mutations de *CFTR* sur différents aspects moléculaires et dans un environnement *in vivo*.

Plusieurs modèles murins ont été développés pour l'étude de CFTR (= souris CF pour Cystic Fibrosis). Il est possible de distinguer deux types de modèles : les souris invalidées pour le gène *Cftr* dites KO (Knockout) et les souris dans lesquelles une mutation du gène *Cftr* a été introduite (Figure 5).

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

De manière générale, la pathophysiologie intestinale de ces modèles murins est très similaire à celle observée chez l'Homme. Ces souris présentent à la fois des défauts de sécrétion macromoléculaire avec un épaissement du mucus intestinal et des défauts de transport ionique avec une sécrétion de Cl^- et HCO_3^- réduite ou absente et une absorption accrue de Na^+ (126). Ces modèles d'études sont généralement utilisés pour étudier la physiologie fondamentale du transport des ions.

			Phénotype			
	Souris	Cible / mutation	Resp.	Dig.	Fond Génétique	Réf.
Knockout	CFTR^{tm1Unc}	Codon stop dans l'exon 10	+	+++	C57Bl/6-129/Sv, BALB/c-129/Sv, B6D2-129/Sv	(127)
	CFTR^{tm1Hgu}	Insertion dans l'exon 10	-	+	MF1-129/Sv	(128)
	CFTR^{tm1Cam}	Insertion dans l'exon 10	-	+++	MF1-129/Sv, C57Bl/6-129/Sv	(129)
	CFTR^{tm1Bay}	Duplication insertionnelle dans l'exon 3	-	+++	C57Bl/6-129/Sv	(130)
	CFTR^{tm3Bay}	Codon stop dans l'exon 2	-	+++	C57Bl/6-129/Sv	(131)
	CFTR^{tm1Hsc}	Insertion dans l'exon 1	-	+++	CD1-129/Sv	(132)
Mutations	CFTR^{tm1Kth}	Insertion de la mutation F508del dans l'exon 10	-	+++	C57Bl/6-129/Sv	(133)
	CFTR^{tm1Eur}	Insertion de la mutation F508del dans l'exon 10	-	+	FVB-129/Sv	(134)
	CFTR^{tm2Cam}	Insertion de la mutation F508del dans l'exon 10	-	+++	C57Bl/6-129/Sv	(135)
	CFTR^{tm1G551D}	Insertion de la mutation G551D dans l'exon 11	-	++	CD1-129/Sv	(136)
	CFTR^{tm2Hgu}	Insertion de la mutation G480C dans l'exon 10	-	+++	C57Bl/6-129/Sv	(137)

Figure 5 : Modèles murins existant pour l'étude de la protéine CFTR. Tableau adapté de "Cystic fibrosis mouse models. Guilbault C. Am J Respir Cell Mol Biol. 36-1. p 1-7. 2007", "Pathophysiology of Gene-Targeted Mouse Models for cystic fibrosis. Grubb B.R. and Boucher R.C. Physiological review. 79-1. p S193-S214. 1999" et "Un modèle murin mimant les manifestations pulmonaires de la mucoviscidose vient d'être mis au point. Sauty A et Aubert J-D. Revue des Maladies Respiratoires. 22. p 17-19. 2005".

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

Au niveau pulmonaire, il a d'abord été considéré que les animaux examinés étaient trop jeunes et élevés dans un environnement semi-stérile, pour développer des problèmes respiratoires mais que si cette barrière semi-stérile était levée la pathologie des voies aériennes se manifesterait (de la même manière que lorsque les nourrissons atteints de mucoviscidose naissent et s'exposent aux pathogènes).

Cependant, cette hypothèse n'a pas pu être étayée puisque l'histologie des poumons de souris CF est normale et ne présente pas de colmatage des bronches dû au mucus épais (136),(128). En effet, les études avec des souris CFTR^{tm1Unc} vieillissantes n'ont pas permis de soutenir l'hypothèse selon laquelle des souris CF âgées et élevées dans un environnement moins stérile pourraient présenter des atteintes respiratoires.

Néanmoins, il a été signalé que des souris CFTR^{tm1Hgu} exposées longuement et de manière répétée à des nébulisations de *Staphylococcus aureus* développaient des anomalies pulmonaires. En l'occurrence ces souris présentaient une incidence significativement plus élevée d'hyperplasie à cellules caliciformes, de rétention de mucus et de bronchiolite par rapport aux individus non infectés (138). De plus, dans ces modèles exposés à des pathogènes, une augmentation du nombre de colonies bactériennes a été observée, suggérant un défaut de clairance pulmonaire.

D'autres travaux ont montré que les souris CF ne présentent aucune hyperabsorption de Na⁺ et sécrètent significativement des ions Cl⁻ en réponse à la forskoline (un activateur de CFTR) (139). L'absence d'hyperabsorption du sodium peut être expliquée par une faible expression de CFTR-wt dans les souris sauvages. Ainsi CFTR-wt n'aurait que peu d'influence sur l'absorption du sodium et son invalidation dans les souris CF n'aurait pas ou peu d'impact. La sécrétion normale d'ions Cl⁻ chez les souris CF serait médiée par le calcium intracellulaire indépendamment de CFTR. Cependant, la stimulation par des agents augmentant le calcium intracellulaire (ATP, ionomycine) n'induit pas de sécrétion plus importante de chlore (140) hormis pour les modèles CFTR^{tm2Cam} et CFTR^{tm1G551D} (135),(136).

Il semblerait que dans la trachée murine, la voie sécrétoire alternative de Cl⁻ (Cl_A) soit beaucoup plus dominante que la voie CFTR médiée par l'AMPc et que, dans certains cas, la voie Cl_A soit régulée positivement dans les tissus des voies respiratoires des souris CF.

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

Enfin, il a été montré que les souris CFTR^{tm1Unc} ne présentent aucun marqueur de l'inflammation au niveau pulmonaire (127) hormis une augmentation du taux basal d'IL-8 dans le liquide de surface bronchique (141).

IV.3. Thérapies moléculaires : Potentiators/correcteurs de CFTR

Depuis l'identification du gène *CFTR* et des dysfonctions de la protéine CFTR, de nombreuses études ont été menées dans le but de rechercher des molécules ayant un effet sur la protéine CFTR. L'activité de la protéine CFTR est connue pour être régulée principalement par phosphorylation/déphosphorylation. Ainsi, des composants naturels et inducteurs de phosphorylation tels que les alkylxanthines (caféine, théophylline) ont été les premières molécules modulatrices de CFTR identifiées (142).

	Classe	Molécule	Chlore sudoral	Réponses cliniques	
				VEMS	Exacerbation pulmonaire
Gly551Asp	III	Ivacaftor	Diminution de 50%	Augmentation de 10%	Diminution de 40%
Gly551Ser, Gly178Arg, Gly1244Glu, Gly1349Asp, Ser549Asn, Ser549Arg, Ser1251Asn, Ser1255Pro	III	Ivacaftor	Diminution de 50%	Augmentation de 10%	ND
Arg117His	IV	Ivacaftor	Diminution de 25%	Augmentation de 3%	ND
Gly542X	I	Ataluren	=	=	Pas d'effet
Phe508del	II	Ivacaftor + Lumacaftor	Diminution de 8%	Augmentation de 3%	Diminution de 30%

Figure 6 : Résumé de résultats d'essais cliniques adaptés aux différentes mutations de CFTR. VEMS : Volume Expiratoire Maximum par Seconde. ND : Non Déterminé. Tableau adapté de "Cystic Fibrosis. Elborn J.S. Lancet. 388-10059. p 2519-2531. 2016".

D'autres molécules naturelles comme la curcumine, l'escine, extraite du marronnier, ou encore le resveratrol ont été étudiées pour leurs propriétés inhibitrice de kinase, anti-inflammatoire et anti-oxydante respectivement mais sans effet significatif *in vivo*. Il a aussi été montré que le N-butyldeoxynojirimycin, appelé miglustat (Zavesca®) corrige le transport des ions Cl⁻ et Na⁺ en restaurant le trafic cellulaire de CFTR-deltaF508, mais ces

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

effets observés *in vitro* et lors des phases précliniques n'ont pas été confirmés lors des essais cliniques de phase II ([143](#)).

Par la suite, le développement du screening à haut débit a permis d'identifier de nombreuses molécules prometteuses qui ont été catégorisées en deux grandes familles de molécules : les potentiateurs et les correcteurs de CFTR.

La société Vertex Pharmaceuticals (Boston, USA) a notamment développé deux molécules. La première, VX-809, plus communément appelée Lumacaftor, est un correcteur de CFTR qui permet de restaurer le trafic cellulaire de CFTR-deltaF508, de corriger son repliement et de la stabiliser à la membrane ([144](#)). Les patients homozygotes pour deltaF508 ont montré une diminution significative du chlore dans leur sueur après quatre semaines de traitement, néanmoins aucune amélioration de la fonction respiratoire n'a pu être observée. La deuxième molécule, le VX-770 ou Ivacaftor (Kalydéco®), est un potentiateur de CFTR approuvé chez les patients porteurs de la mutation G551D (4-5% des patients) et qui permet d'améliorer l'ouverture du canal CFTR-deltaF508 en combinaison avec un traitement au VX-809. Ainsi l'association des deux molécules VX-809 et VX-770 semble intéressante et a obtenu en 2015 une autorisation temporaire d'utilisation sous le nom d'Orkambi® pour les patients homozygotes deltaF508 (Figure 6). Cependant, l'efficacité de ce traitement est variable entre deux patients et ne semble pas avoir d'effet chez les patients hétérozygotes pour deltaF508. L'entreprise Vertex a aussi développé le VX-661 ou Tézacaftor qui, en association avec le VX-770, semble montrer une efficacité légèrement supérieure au VX-809 (en 2018 la Food Drug Administration FDA a autorisé la combinaison du VX-770 et du VX-661 sous le nom de Symdeko®).

D'autres molécules telles que le VX-152 et le VX-440 sont actuellement évaluées, tandis que certaines industries pharmaceutiques telles que Proteostasis Therapeutics (Cambridge, USA) et Flatley Discovery Lab (Charlestown, USA) développent eux aussi des correcteurs agissant de manière différente du VX-809 et promettant une efficacité supérieure ([145](#)).

Enfin, la société ProQR Therapeutics NV (Leiden, Pays-Bas) s'oriente davantage sur le développement d'ARN simple brin (QR-010). Ces ARN sont spécifiquement modifiés de manière à corriger la mutation deltaF508 au niveau de l'ARNm afin de générer un ARNm de *CFTR* sain. Les tests précliniques chez la souris ont montré une augmentation de l'activité de CFTR et une régulation du taux de sécrétion dépendant de CFTR ([146](#)). Les

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

phases cliniques suivantes sont actuellement en cours et permettront de valider la sécurité de la molécule mais également la preuve de concept.

Malgré ces médicaments disponibles et/ou en cours de développement, la mucoviscidose demeure une maladie incurable et souvent fatale sans transplantation pulmonaire. La recherche de nouvelles thérapies reste donc une priorité qui s'oriente de plus en plus vers une médecine personnalisée, notamment avec le développement et la culture d'organoïdes intestinaux issus de patients. Cette nouvelle technique a pour but de tester des molécules sur du tissu spécifique au patient et propre à sa mutation dans un environnement cellulaire plus proche de la réalité en comparaison à la culture cellulaire primaire traditionnelle (147).

IV.4. Description des atteintes cliniques

La mucoviscidose est une maladie multi-viscérale qui affecte principalement les tissus épithéliaux. Les organes majoritairement concernés sont l'appareil respiratoire, le système digestif (comprenant les intestins et le pancréas), et le système uro-génital. La mucoviscidose peut conduire à des phénotypes très diversifiés, ce qui explique les nombreuses différences dans les symptômes observés entre deux patients, et cela même lorsqu'ils possèdent une mutation identique. Néanmoins, la mucoviscidose reste une maladie chronique qui s'exprime de manière progressive et généralement durant la petite enfance voire même dès la naissance avec notamment la présence d'iléus méconial. Par la suite, les différentes atteintes cliniques décrites ci-dessous apparaissent au cours de la vie du patient (Figure 7) selon la ou les mutations qu'il porte :

	0-10 ans	10-20 ans	20-35 ans	>35 ans
<u>Voies aériennes</u>	Épaississement du mucus et bronchectasie précoces	Bronchectasie établit	Bronchectasie établit avec hémoptysie et pneumothorax	Insuffisance respiratoire → transplantation pulmonaire
<u>Principales infections</u>	<i>S.aureus</i>	Intermittence <i>S.aureus</i> / <i>P.aeruginosa</i>	<i>P.aeruginosa</i> et autres bactéries Gram- non fermentatives, ABPA	-
<u>Pancréas</u>	Insuffisance pancréatique exocrine	-	Diabète de type I	-
<u>Foie</u>	Dysfonctions hépatiques	Cirrhose	Hypertension de la veine porte	Transplantation hépatique
<u>Intestins</u>	Iléus méconial	-	Syndrome d'obstruction intestinale distale	-
<u>Appareil reproducteur</u>	Absence de canal déférent	-	-	-
<u>Autre</u>	-	-	Arthropathie et ostéoporose	-

Figure 7 : Apparition des symptômes cliniques de la mucoviscidose en fonction de l'âge. ABPA : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique. Tableau adapté de "Cystic Fibrosis. Elborn J.S. Lancet. 388-10059. p 2519-2531. 2016".

I.1.14.L'atteinte génitale

Plus de 95% des hommes sont stériles en raison d'une absence bilatérale congénitale du canal déférent (CBAVD) et d'une azoospermie obstructive (148). La réduction de la fertilité chez les femmes ne semble pas avoir une cause anatomique (149). Cette infertilité est principalement due à l'épaississement du mucus cervical qui ne subit pas les changements typiques au cours des menstruations et dont les concentrations en électrolytes sont dérégulées. Ainsi le mucus cervical des femmes atteintes de mucoviscidose devient imperméable au passage des spermatozoïdes (150),(151). Cependant, il a également été proposé que les perturbations de la fertilité féminine dans la mucoviscidose soient liées à un dysfonctionnement de l'ovulation et à une déficience en acide gras essentiels (152)

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

I.1.15.L'atteinte pancréatique et biliaire

Les cellules épithéliales des canaux pancréatiques et biliaires sont également affectées par les mutations de *CFTR*. En effet, *CFTR* est présent dans les canaux pancréatiques pour permettre le transport des ions Cl^- et HCO_3^- et obtenir un environnement alcalin. Les cellules épithéliales pancréatiques absorbent le chlore et sécrètent le bicarbonate (153). Au sein du mucus pancréatique, les ions bicarbonates neutralisent les acides gastriques et procure un pH basique optimal pour le bon fonctionnement des enzymes pancréatiques (153),(154). Dans le cas de la mucoviscidose, les dysfonctionnements des échanges anioniques ont pour conséquence l'obstruction progressive des canaux pancréatiques, la destruction des acini pancréatiques et dans les cas les plus grave aboutissent à une fibrose du pancréas.

I.1.16.L'atteinte métabolique

Les progrès médicaux ont permis d'augmenter considérablement l'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose mais à contrario, ils ont aussi permis le développement d'autres pathologies en parallèle de la mucoviscidose.

Le diabète associé à la mucoviscidose est un problème croissant qui affecte environ 40% de la population mucoviscidosique et qui est associé à un mauvais pronostic vital surtout pour les femmes (155),(156). De nombreux patients souffrent également d'ostéopénie. En effet, les retards de puberté causent une faible densité minérale osseuse et la présence d'une réponse inflammatoire chronique favorise l'ostéopénie (157),(158). Enfin, les patients présentent souvent des atteintes rénales en raison de l'administration répétée d'antibiotiques tels que les aminoglycosides, comme la gentamicine, qui s'avèrent être nephrotoxique (156).

I.1.17.L'atteinte pulmonaire

Les atteintes respiratoires sont responsables de la morbidité et de la mortalité de la mucoviscidose. Ce sont les symptômes les plus sévères et ils représentent un enjeu majeur dans le développement de thérapies. La principale pathologie dans le poumon est l'inflammation des bronches générée d'une part, par la diminution voire l'absence de clairance muco-ciliaire qui ne permet pas d'éliminer les microorganismes présents dans le mucus et d'autre part, par la génération d'un microenvironnement pro-inflammatoire et toxique pour le tissu pulmonaire (159),(156). Ces différents problèmes apparaissent très tôt dans la vie des patients (quelques mois pour certains) et se caractérisent par une bronchectasie des voies respiratoires (160),(161). La bronchectasie (Figure 8) est accompagnée d'une augmentation de l'élastase sécrétée par les neutrophiles qui conduit à la perturbation des défenses immunitaires innées, à une augmentation de la production de

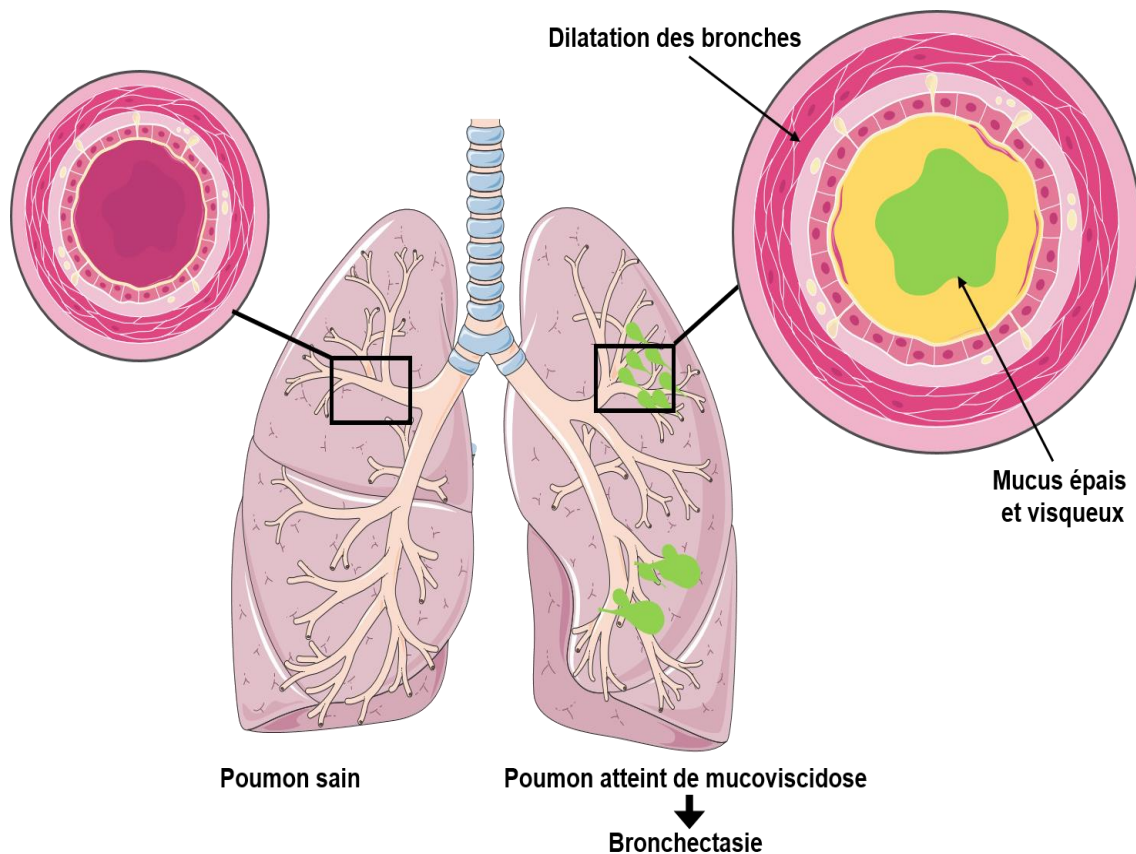


Figure 8 : Comparaison entre une bronche saine et une bronche atteinte de bronchectasie. Schéma adapté du "National Heart Lung and Blood Institute".

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

mucus, à une dégradation des peptides protecteurs du mucus et à la digestion de la matrice extracellulaire (162),(163).

L'inflammation pulmonaire chronique est une caractéristique physiopathologique inévitable pour les patients atteints de mucoviscidose. Cette inflammation chronique se caractérise par un taux élevé de polynucléaires neutrophiles (PNN) avec une transmigration endothéliale accrue via l'expression exacerbée de la protéine ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) mais également une migration paracellulaire anormale due à un relâchement des jonctions serrées. Ces nombreux PNN sécrètent de l'élastase en très grande quantité et ne remplissent plus leur rôle de cellules suppressives (164). En effet, les récepteurs des PNN sont altérés et ne permettent plus la phagocytose.

Les PNN affluent sous l'influence de médiateurs pro-inflammatoires qui sont dérégulés dans la mucoviscidose. Les patients montrent une augmentation de la cytokine IL8 (165), du leucotriène B4 (166) et du facteur de croissance GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) et une diminution de la cytokine anti-inflammatoire IL10.

Par la suite, ces PNN subissent un processus d'apoptose, ils libèrent alors les protéases et autres ROS (Reactive Oxygen Species) qu'ils contiennent. Ces diverses molécules présentent en quantité anormalement élevée deviennent néfastes et conduisent à la destruction du tissu bronchique (167). A long terme, la destruction du tissu bronchique provoque une insuffisance respiratoire et sans transplantation pulmonaire peut conduire au décès du patient.

L'ensemble de ces données montrent que la protéine CFTR possède de très nombreuses fonctions et participe à de multiples processus physiologiques mais dont les bases moléculaires restent encore à éclaircir.

A ce stade de la recherche, nous savons que les atteintes pulmonaires induites par les mutations de *CFTR* sont responsables de la morbidité et de la mortalité des patients atteints de mucoviscidose. Dans ce contexte, la protéine CFTR participe à la régulation de canaux ioniques, au trafic protéique intracellulaire, aux infections bactériennes, au processus inflammatoire exacerbé et dans la perméabilité de la barrière épithéliale bronchique.

Cette barrière épithéliale bronchique est un élément clé dans la protection des voies aériennes. Elle constitue une barrière physique entre la lumière des bronches et le parenchyme pulmonaire et régule la perméabilité épithéliale. Dans la mucoviscidose, la

Introduction : Chapitre I – La mucoviscidose

barrière jonctionnelle bronchique est altérée et la perméabilité épithéliale est augmentée suggérant un rôle de la barrière épithéliale dans les infections chroniques et l'inflammation. Cette perméabilité accrue permettrait le passage des pathogènes vers le tissu pulmonaire et la libération de cellules de l'inflammation dans la lumière des bronches. Cependant, ce phénomène est controversé puisque certaines études suggèrent une migration trans-cellulaire des bactéries au travers de l'épithélium, tandis que d'autres proposent un passage para-cellulaire provoqué par un relâchement des jonctions cellulaires. De plus, les rôles de CFTR au sein de la barrière épithéliale sont peu connus.

Ainsi pour mon projet de thèse, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la barrière épithéliale bronchique, des protéines jonctionnelles et du rôle de CFTR dans cette organisation cellulaire.

Chapitre II : La barrière épithéliale bronchique

I. Les épithéliums au sein des poumons

Le système respiratoire comprend les voies aériennes supérieures extra-thoraciques (nez, fosses nasales, bouche, pharynx et larynx) et les voies aériennes inférieures intra-thoraciques constituées par la trachée, les bronches et bronchioles et les alvéoles pulmonaires. Les voies aériennes inférieures forment les poumons et doivent strictement rester stériles pour leur bon fonctionnement. Les poumons humains sont divisés en deux parties ; le poumon droit et le poumon gauche, eux-mêmes subdivisés en trois et deux lobes respectivement (Figure 9). Les deux poumons sont séparés par le médiastin et sont enveloppés par la plèvre, une membrane séreuse, au sein de la cage thoracique.

La structure des poumons peut varier entre différents mammifères, notamment entre l'Homme et la souris. En effet, le poumon murin droit est divisé en quatre lobes tandis que le poumon gauche n'en contient qu'un seul.

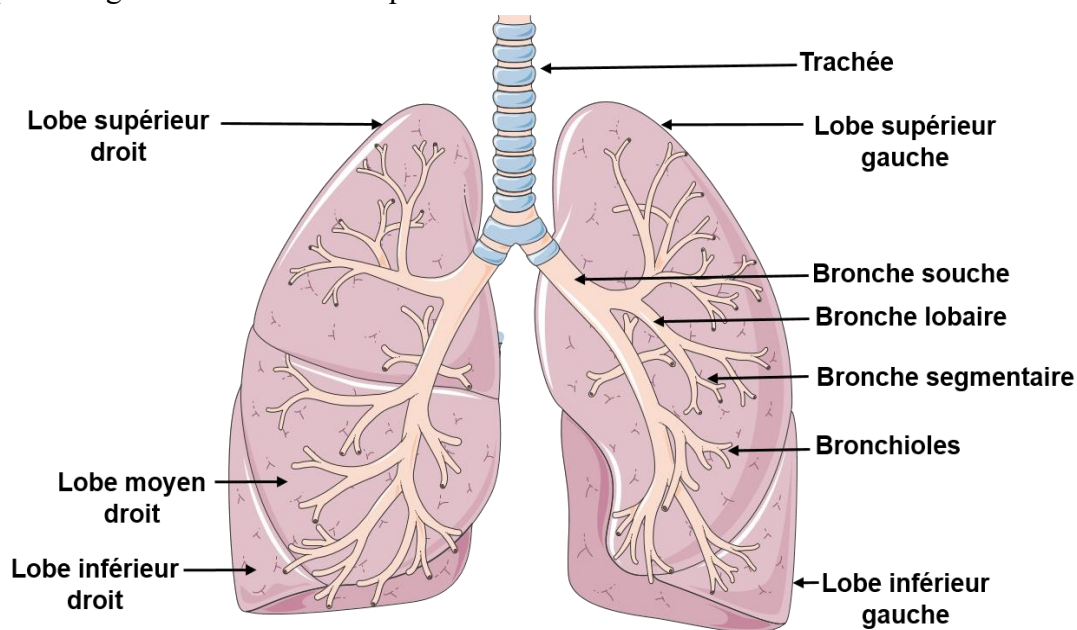


Figure 9 : Structure générale des poumons humains.

Les tissus épithéliaux respiratoires sont présents depuis la trachée jusqu'aux bronchioles et exercent la fonction de barrière protectrice dynamique. Tout au long de l'arbre bronchique, les cellules qui tapissent les parois de ces conduits suivent un gradient d'épaisseur et de proportion pour former un tissu épithélial (Figure 10).

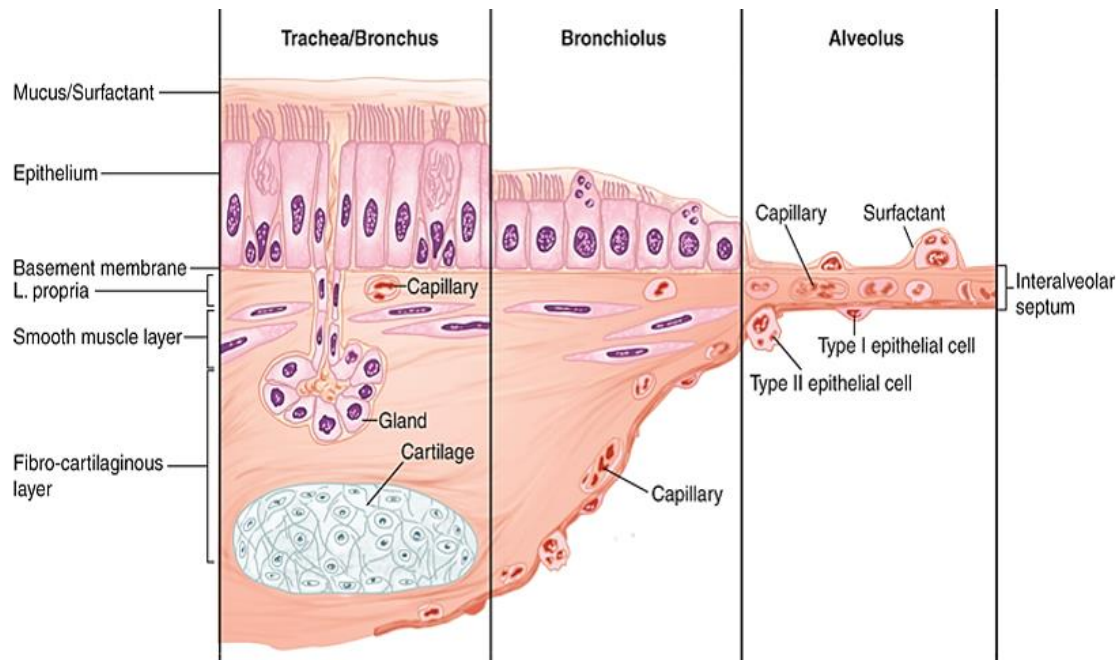


Figure 10 : Transition cellulaire depuis la trachée jusqu'aux alvéoles. D'après " Ganong's Review of medical physiology 25th Ed. Barret K.E. et al. 2015".

Les cellules formant les épithéliums sont solidairement juxtaposées les unes aux autres afin de former une barrière physique. Cette cohésion cellulaire permet également de réguler la perméabilité du tissu épithélial. Les cellules épithéliales ont la capacité de se polariser et d'organiser spécifiquement la position de leurs organites. Le pôle apical des cellules est orienté vers la lumière de l'organe tandis que le pôle basal est orienté vers le tissu conjonctif sous-jacent intimement lié à la lame basale.

Au niveau de la trachée et des bronches, l'épithélium de revêtement est pseudo-stratifié et cylindrique tandis qu'il devient monostratifié dans les bronchioles. Progressivement, les cellules caliciformes pluristratifiées deviennent des cellules unistratifiées. De la trachée jusqu'aux bronchioles, l'épithélium est cilié et recouvert de liquide de surface, le mucus. Enfin au niveau alvéolaire, les cellules sont complètement différentes des cellules épithéliales. Il s'agit des pneumocytes de type I et II qui possèdent chacun un rôle fondamental. Les pneumocytes de type I sont responsables des échanges gazeux dans le sang. En effet, la membrane basale des pneumocytes I est fusionnée à la membrane des cellules endothéliales ce qui permet un lien direct avec les capillaires sanguins. Tandis que les pneumocytes de type II sécrètent le surfactant, un liquide permettant de fluidifier le mucus et de réduire la tension de surface exercée par le mucus sur les alvéoles.

II. Structure d'un épithélium bronchique sain

Pour assurer ses multiples fonctions, l'épithélium bronchique est composé de plusieurs types cellulaires sensiblement les mêmes depuis la trachée jusqu'aux bronchioles et qui ont été divisés en trois catégories (Figure 11) :

II.1. Les cellules ciliées

Les cellules ciliées sont les principales cellules de l'épithélium pseudostratifié puisqu'elles représentent plus de 50% des cellules totales (168). Ce sont des cellules issues de cellules basales ou sécrétoires (169),(170), polarisées et qui une fois différenciées acquièrent des cils à la surface membranaire apicale. Ces nombreux cils permettent aux cellules d'assurer un mouvement mécanique qui joue un rôle crucial dans la clairance mucociliaire. Ce mouvement ciliaire est possible grâce aux nombreuses mitochondries présentes à la surface apicale des cellules ciliées et qui fournissent l'énergie nécessaire aux battements des cils (171). Certaines études ont proposé un rôle des cellules ciliées dans le remodelage et la régénération de l'épithélium bronchique (172),(173).

II.2. Les cellules sécrétrices

Parmi les cellules sécrétrices de l'épithélium bronchique, il est possible de distinguer deux grands types cellulaires : les cellules caliciformes à mucus présentes depuis la trachée jusqu'aux bronches et les cellules club qui remplacent progressivement les cellules caliciformes dans les petites bronches et bronchioles.

Les cellules caliciformes à mucus sont caractérisées par la présence de granules de mucines au sein de leur cytoplasme. Ces mucines sont sécrétées par la cellule dans la lumière de l'épithélium afin de piéger les particules et pathogènes inhalés (174). Certaines pathologies respiratoires telles que l'asthme, la BPCO (Bronchopneumopathie Chronique Obstructive) ou encore la mucoviscidose entraînent des perturbations dans la production de mucus et conduisent à des lésions pulmonaires. Enfin, il a été montré que les cellules caliciformes sont capables de s'auto-renouveler et dans certains cas de se trans-différencier en cellules ciliées, notamment lors de la régénération de l'épithélium (175).

Les cellules club, anciennement appelées cellules de Clara, sécrètent un liquide de surface similaire au surfactant alvéolaire contenant notamment des glycosaminoglycanes ou des lysozymes.

II.3. Les cellules basales

Les cellules basales s'organisent en monocouches de cellules pour former la structure pseudostratifiée de l'épithélium (176). Les cellules basales sont directement connectées à la membrane basale grâce aux héli-desmosomes et représentent les fondations de l'épithélium sur lesquelles viennent se fixer les cellules ciliées et sécrétrices (177),(178). Ces cellules basales participent aux défenses anti-oxydantes, aux échanges d'eau transépithéliaux ainsi qu'à la réponse inflammatoire (179). En effet, en réponse aux signaux inflammatoires, les cellules basales sont capables de réguler positivement l'expression de certains récepteurs de l'inflammation tels que la molécule d'adhésion ICAM-1 (180).

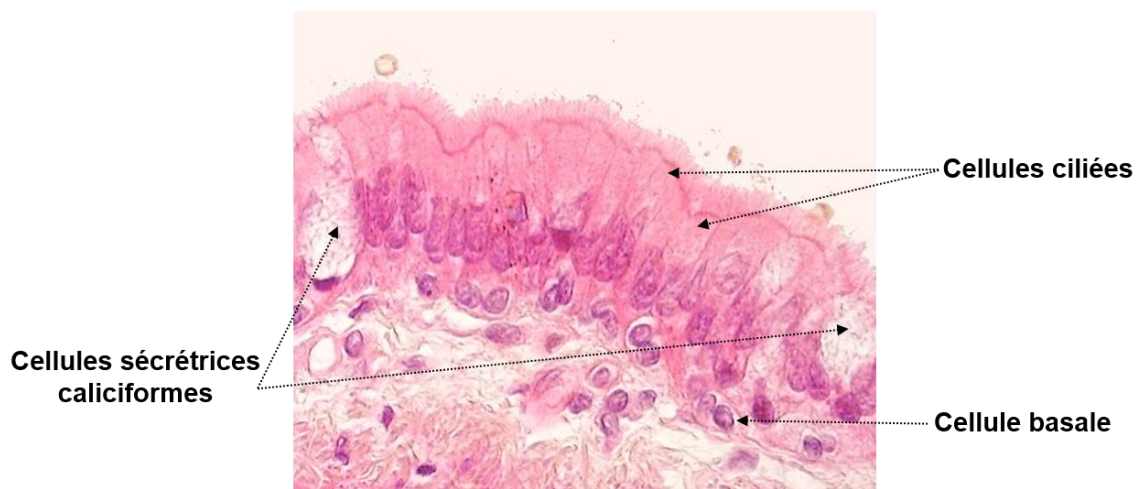


Figure 11 : Localisation tissulaire des différentes cellules formant l'épithélium bronchique humain.

III. Rôle de barrière protectrice

Le tissu épithélial bronchique constitue une véritable barrière directement en contact avec l'air inhalé. Ce tissu protecteur forme d'une part, une barrière physique par l'établissement et le maintien de jonctions cellulaires protéiques entre les cellules épithéliales, et d'autre part, une barrière chimique par la sécrétion de nombreuses molécules protectrices aux activités antimicrobiennes, anti-oxydantes ou encore pro-inflammatoires.

III.1. Clairance mucociliaire

La clairance mucociliaire est l'action mécanique permise par le battement coordonné des cils présents à la surface apicale des cellules ciliées. Elle consiste à éliminer les particules et pathogènes pris au piège dans le mucus vers l'extérieur des bronches. Le mucus contient des molécules antimicrobiennes comme la lactoferrine et le lysozyme (181) et des

molécules de défenses comme les protéases ou les défensines sécrétées par les cellules épithéliales.

III.2. Jonctions cellulaires

Les jonctions cellulaires sont des protéines transmembranaires et cytosoliques organisées spécifiquement au sein des épithéliums afin de maintenir les cellules épithéliales entres-elles.

Les jonctions serrées sont organisées en couronne au pôle apical des cellules tandis que les jonctions adhérentes et desmosomes ont une localisation basolatérale permettant l'adhérence intercellulaire (Figure 11). Il existe également les jonctions hémi-desmosomes qui assurent l'ancrage des cellules épithéliales à la lame basale et les jonctions communicantes ou jonctions GAP qui ne participent pas au maintien physique de l'épithélium mais qui permettent la communication intercellulaire, la transmission de signaux cellulaires, la synchronisation cellulaire et le maintien de l'homéostasie tissulaire.

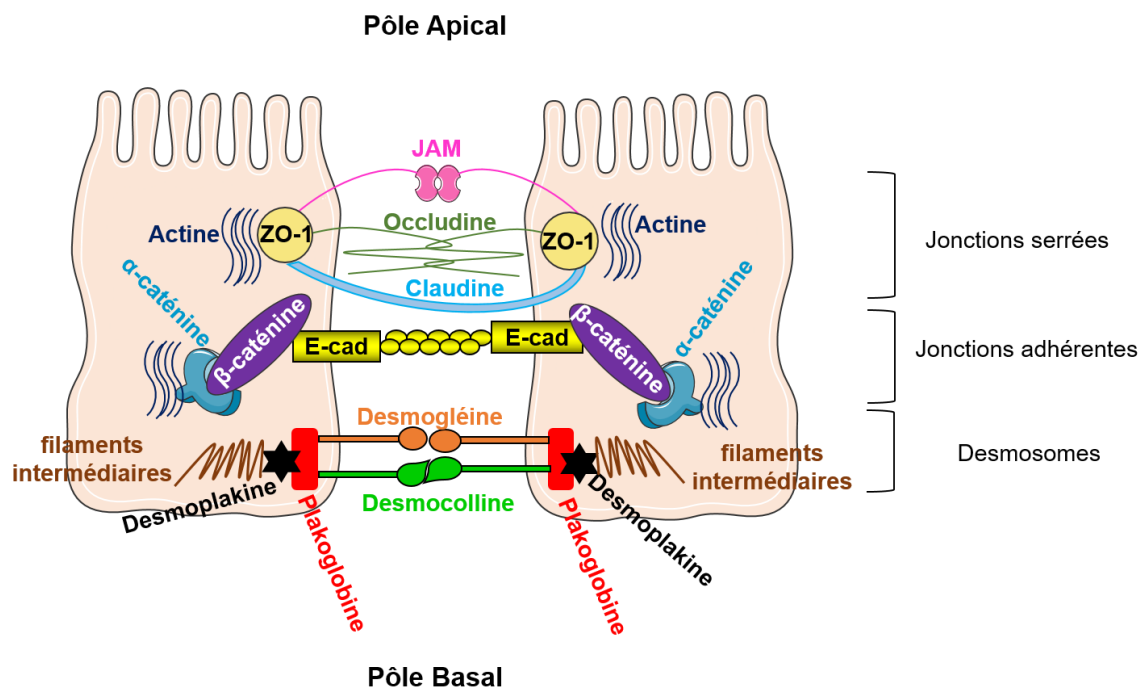


Figure 12 : Schéma de l'organisation des jonctions cellulaires entre deux cellules épithéliales.

III.2.1. Les jonctions serrées

Les jonctions serrées représentent les protéines responsables de la perméabilité et de la sélectivité de l'épithélium vis-à-vis des ions et de certaines molécules. Les jonctions serrées régulent ainsi le passage paracellulaire de solutés et permettent également d'assurer

l'étanchéité tissulaire entre les différents compartiments (182). Ces protéines sont également responsables de la frontière entre le pôle apical et le pôle basal des cellules et maintiennent les cellules polarisées. Les protéines appartenant aux jonctions serrées se divisent en trois grandes familles : Les claudines, les occludines et les JAM (Junctional Adhesion Molecule) qui vont chacune s'associer à des protéines adaptatrices intracellulaires de la membrane périphérique. Les protéines ZO interagissent directement avec le cytosquelette d'actine (Figure 13).

L'occludine est une protéine constituée de quatre domaines transmembranaires et de deux boucles extracellulaires. Cette protéine participe au maintien de la RTE et à la régulation du flux paracellulaire. Néanmoins, cette protéine ne semble pas essentielle à l'établissement des jonctions serrées puisque des cellules souches invalidées pour le gène de l'occludine forment des jonctions serrées fonctionnelles (183). L'occludine établit des jonctions dans une forme hyperphosphorylée en s'associant à la protéine ZO-1. Certains facteurs peuvent perturber ces interactions et rompre l'intégrité épithéliale. C'est le cas de la cystéine

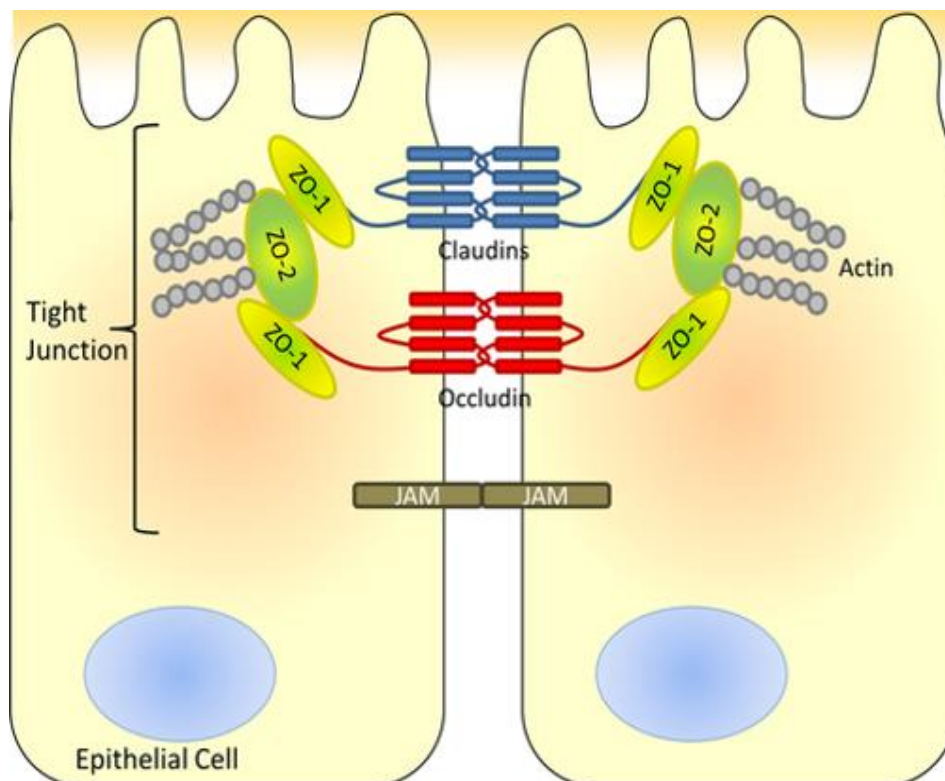


Figure 13 : Représentation schématique des jonctions serrées dans une cellule épithéliale. D'après "Temporal and regional intestinal changes in permeability, tight junction, and cytokine gene expression following ovariectomy-induced estrogen deficiency" Collins, F. L. et al. Physiological reports. 5-9. e13263. 2017.

Introduction : Chapitre II – La barrière épithéliale bronchique

protéase de l'allergène Der p1 qui clive la liaison occludine-ZO-1 et entraîne une augmentation de la perméabilité paracellulaire (184).

La famille des protéines claudines dénombre 24 claudines chez l'Homme qui sont capables d'interagir entre elles via des liaisons homo- ou hétérophiliques. Tout comme l'occludine, les claudines comportent quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires cytoplasmiques capables d'interagir avec ZO-1 mais également ZO-2 et ZO-3. Au sein de l'épithélium bronchique, les claudines 1, 2, 3, 4, 5 et 7 sont exprimées (185),(186).

Il existe trois types de protéines JAM : A, B et C (187). Ce sont des glycoprotéines appartenant à la famille des immunoglobulines (Ig) car elles possèdent un domaine extracellulaire de type Ig et elles comportent également un motif de liaison à ZO-1 dans leur partie C-terminale. En plus de participer à la régulation de la perméabilité paracellulaire de l'épithélium, les protéines JAM sont capables d'interagir avec les leucocytes en s'associant aux intégrines. Cette association facilite alors l'adhésion et la migration trans-endothéliale des leucocytes (188).

Enfin, les protéines de la famille ZO sont considérées comme des jonctions serrées mais leur localisation cellulaire ainsi que leur structure sont différentes de celles des claudines, occludine et JAM. La protéine ZO ou Tight Junction Protein-1 (TJP-1), qui appartient à la famille des protéines MAGUK (Membrane-Associated Guanylate Kinase), comporte un domaine PDZ, un domaine SH3 (Src homology 3) et un domaine GK (Guanylate Kinase) (189). Les domaines PDZ reconnaissent un court motif peptidique sur leurs cibles protéiques et permettent la liaison de ZO aux autres protéines. Les domaines SH3 sont retrouvés dans de nombreuses protéines de signalisation et du cytosquelette où ils participent aux liaisons directes protéine-protéine, à la localisation subcellulaire et à la formation de complexes multiprotéiques. Cependant, les ligands des domaines SH3 n'ont pas été caractérisés. Le domaine GK est homologue à l'enzyme guanylate kinase qui catalyse la conversion du GMP (Guanosine Mono-Phosphate) en GDP (Guanosine Di-Phosphate) en présence d'ATP. Cependant, cette activité enzymatique n'a jamais été décrite pour le domaine GK d'une protéine MAGUK (190). Les protéines ZO sont souvent appelées protéines adaptatrices de par leur localisation à la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Elles lient les protéines des jonctions serrées par leur extrémité N-terminale et les filaments d'actine par leur extrémité C-terminale afin de ceinturer la

structure et maintenir l'adhésion intercellulaire (191),(192). Les protéines ZO-1 et ZO-2 sont également connues pour interagir avec certaines protéines des jonctions adhérentes lorsque les cellules ne synthétisent pas de jonctions serrées comme les fibroblastes (193) et participent à la communication intercellulaire via des liaisons avec les connexines des jonctions GAP (194). Enfin, les protéines ZO sont capables d'interagir aussi entre-elles via leur domaine PDZ.

III.2.2. Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont des complexes protéiques adhésifs composés principalement par des glycoprotéines transmembranaires de type cadhérine (comme la E-cadhérine) qui s'associent avec des protéines cytoplasmiques de la famille des caténines pour former des liaisons stables et solides entre les cellules épithéliales (195) (Figure 14). Outre l'initiation et la stabilisation de l'adhésion cellulaire, les jonctions adhérentes sont susceptibles de remplir d'autres fonctions. Elles participent à la régulation du cytosquelette d'actine, à la signalisation intracellulaire et peuvent avoir un rôle dans la régulation de la transcription (196).

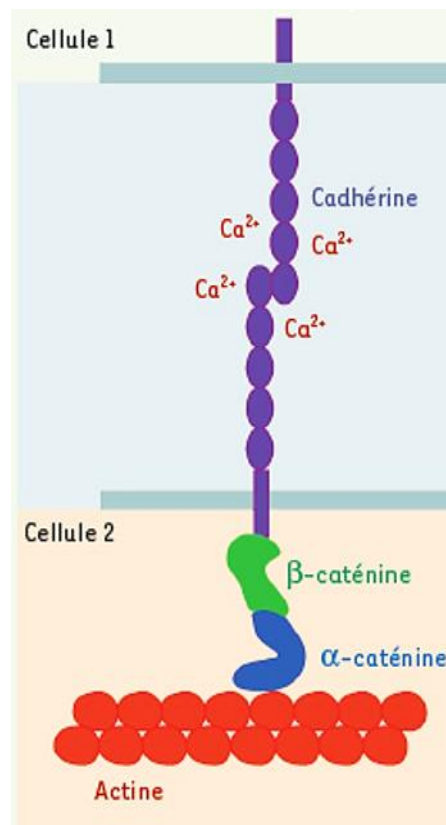


Figure 14 : Représentation schématique des jonctions adhérentes. D'après "Régulation génétique de l'adhérence intercellulaire : Ou comment les cadhérines sculptent la drosophile" Bécam, I. et Huynh, J.R. ipubli inserm MS num. 3, 2017.

Introduction : Chapitre II – La barrière épithéliale bronchique

Les protéines E-cadhérine interagissent entre-elles via des liaisons homophiliques dépendantes du calcium pour former des jonctions entre les cellules. Elles possèdent cinq domaines extracellulaires, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique qui lie les caténines, elles-mêmes liées au cytosquelette d'actine.

La famille des caténines inclue la β -caténine, α -caténine, γ -caténine et la caténine p120 mais seules la β -caténine et la γ -caténine (aussi appelée plakoglobine) sont en interaction directe avec l'extrémité cytoplasmique de la E-cadhérine (197). En effet, les caténines β et γ ont une structure très proche et se lient toutes deux à la E-cadhérine. En revanche la protéine α -caténine ne sert que d'intermédiaire entre les caténines β/γ et les filaments d'actine. La β -caténine possède également un rôle de régulation de la transcription. En effet, lorsqu'elle n'est pas liée à la E-cadhérine, notamment lors des cycles d'endocytose, la β -caténine peut se lier au facteur de transcription Tcf/Lef (Transcription Factor / Lymphoid enhancer-binding factor) et activer la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire aboutissant à l'activation de la voie de signalisation Wnt (Wingless) notamment impliquée dans l'embryogénèse (198),(199).

III.2.3. Les desmosomes

Les desmosomes sont classiquement considérés comme des sites de forte adhésion intercellulaire qui confèrent une intégrité mécanique aux tissus par l'ancrage des filaments intermédiaires (FI) du cytosquelette sur la membrane plasmique (Figure 15). Ces structures hautement organisées sont difficiles à dissoudre et résistent aux pH extrêmes et à la plupart des détergents (200). D'un point de vue ultrastructural, les desmosomes se présentent sous la forme de disques denses aux électrons avec un diamètre d'environ 0,2 à 0,5 μm , qui s'assemblent symétriquement à l'interface entre deux cellules (201). Les FI s'étendent depuis la surface nucléaire et le cytoplasme vers la membrane plasmique, où ils se fixent aux desmosomes en s'insérant dans la plaque cytoplasmique du complexe. Les plaques desmosomales sont composées de différentes familles de protéines : les cadhérines desmosomales transmembranaires (desmoglénines et desmocollines), les protéines à motif Armadillo ou ARM (plakoglobines et plakophilines) qui possèdent une structure constituée d'une quarantaine de résidus d'acides aminés organisés en une séquence répétitive (202) et les protéines plakiniques (desmoplakines) en contact direct avec le cytosquelette des cellules. Les cadhérines desmosomales se lient entre-elles via leur domaine extracellulaire et au sein du cytoplasme, leur extrémité C-terminale se lient aux protéines à motif ARM. Ces liaisons permettent l'interaction indirecte entre les FI et les cadhérines desmosomales

via les plaques de desmoplakines. Tout comme les cadhérines adhérentes, les liaisons entre les cadhérines desmosomales sont dépendantes du calcium. En revanche, les cadhérines desmosomales ont la particularité de pouvoir réaliser des liaisons hétérophiliques avec diverses cadhérines. La plakoglobine fait partie à la fois des jonctions adhérentes lorsqu'elle interagit avec la E-cadhérine, et des desmosomes puisqu'elle comporte un motif ARM spécifique et fait le lien entre les cadhérines desmosomales et la desmoplakine.

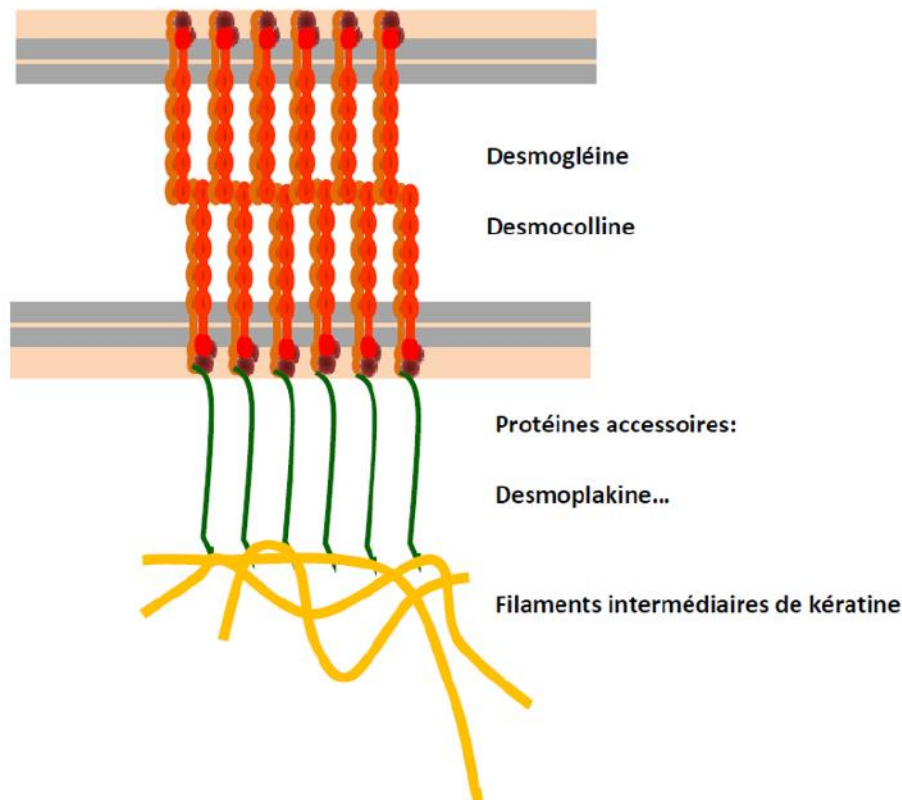


Figure 15 : Représentation schématique des jonctions desmosomes.

IV. Cas de la mucoviscidose : perte de la barrière jonctionnelle bronchique

IV.1. Augmentation de la viscosité du mucus, encombrement et perte de la clairance mucociliaire

L'augmentation de la viscosité du mucus entraînée par un défaut de sécrétion de chlore et une réabsorption importante de sodium et d'eau n'est pas une cause directe de la perte des jonctions bronchiques. En effet, les propriétés rhéologiques du mucus n'affectent pas directement l'organisation des jonctions cellulaires de l'épithélium mais elles favorisent la colonisation bactérienne et perturbent le battement des cils. En situation normale, le mucus

Introduction : Chapitre II – La barrière épithéliale bronchique

est un liquide de surface circulant, qui constitue la première barrière protectrice des poumons (203). Ce liquide de surface des voies respiratoires se compose de deux phases liquides. La première, nommée couche périciliaire, est adjacente aux cellules épithéliales et entoure les cils. C'est la phase directement en contact avec le pôle apical des cellules. Le mucus est la seconde phase au-dessus de la couche périciliaire qui subit le battement des cils et les forces de cisaillement. Ce mucus capte les différentes particules et pathogènes présents dans l'air inhalé afin de les évacuer du système respiratoire via la toux ou les éternuements.

Lorsque le mucus est visqueux et épais, il va progressivement obstruer les bronches. En effet, en raison de la réabsorption massive d'eau hors de la lumière des voies respiratoires, le niveau de liquide périciliaire devient critique et le mucus entre en contact avec les cellules épithéliales. Ainsi, des adhérences se développent entre les mucines de la couche de mucus et les mucines à ancrage cellulaire. À mesure que ces liens adhésifs s'établissent, le mucus devient plus résistant aux thérapies mucolytiques (204). Cependant, il va continuer à piéger les pathogènes mais ne sera plus capable de les expulser. Ainsi les bactéries piégées se retrouvent dans un environnement visqueux, contenant des niches hypoxiques, à température optimale de croissance et peuvent proliférer aisément. La prolifération bactérienne entraîne par la suite la sécrétion de facteurs de pathogénicité qui activent la réponse inflammatoire de l'hôte. A long terme, la réponse inflammatoire du patient qui est systématiquement activée devient exacerbée, détruit le tissu bronchique et finit par entraîner des insuffisances pulmonaires sévères. Ce phénomène est d'autant plus amplifié car les cils présents à la surface apicale des cellules n'exercent plus leurs battements mécaniques (Figure 16).

IV.2.Expression et activité des protéines jonctionnelles

Différentes études se sont intéressées à l'expression des protéines de la famille des claudines dans la mucoviscidose puisqu'elles représentent un élément important des jonctions serrées.

Les claudines sont le principal déterminant de la perméabilité aux électrolytes par la voie paracellulaire (205). Une étude transcriptomique a montré une diminution de l'expression du gène codant pour la claudine 8 dans l'épithélium bronchique mucoviscidosique, tandis qu'une augmentation de l'expression du gène codant pour la claudine 7 a été observée dans l'épithélium nasal de ces patients (206). Aussi, il a été montré qu'une réorganisation néfaste

Introduction : Chapitre II – La barrière épithéliale bronchique

des claudines depuis la membrane latérale vers le cytoplasme existe au sein de l'épithélium des villosités intestinales dans un modèle murin de mucoviscidose (207).

Ces changements de localisation pourraient expliquer l'augmentation de la perméabilité aux macromolécules dans l'intestin grêle et la présence chronique du TNF- α dans la lumière pourrait en être la cause. De manière intéressante, il a été montré qu'un prétraitement de l'épithélium bronchique avec l'azithromycine, un antibiotique, atténue les effets de PA sur les cellules épithéliales des voies aériennes et facilite la récupération de l'activité antimicrobienne de l'épithélium (208). Le traitement à l'azithromycine aurait une action protectrice sur les jonctions serrées puisqu'il augmente l'intégrité de la barrière jonctionnelle et favorise l'assemblage des claudines 1 et 4, de l'occludine et de JAM-A.

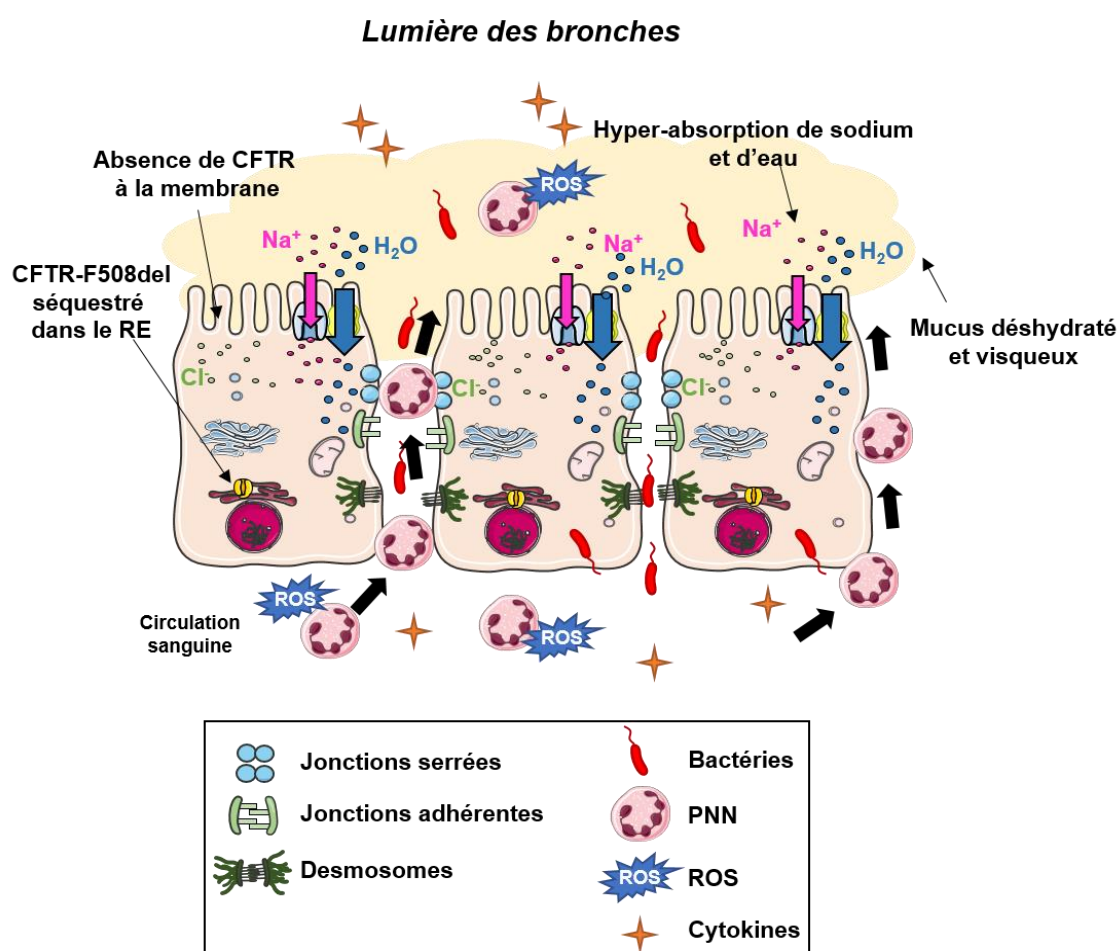


Figure 16 : Schéma de la barrière jonctionnelle bronchique dans le cas de la mucoviscidose. PNN : Polynucléaire Neutrophile, ROS : Reactive Oxygen Species.

Enfin, plusieurs groupes ont montré que l'inflammation chronique des bronches perturbe l'organisation et le maintien des jonctions serrées (209),(210). En effet, l'exposition chronique de TNF- α et d'IFN- α (Interféron alpha), un cocktail pro-inflammatoire mimant

Introduction : Chapitre II – La barrière épithéliale bronchique

les conditions de la mucoviscidose, sur des cultures primaires bronchiques perturbe profondément la RTE et la perméabilité apparente des cellules probablement via la protéine kinase C (211). Ces médiateurs pro-inflammatoires ont conduit à des modifications de l'expression des protéines JAM, ZO-1 ainsi que de la protéine ICAM-1, ce qui expliquerait l'augmentation importante de la trans-migration des neutrophiles dans les bronches.

Outre les infections bactériennes à répétition qui activent le processus inflammatoire dans les bronches, le lien entre l'activité de CFTR et l'inflammation est un sujet très controversé (212),(213). En effet, certains patients présentent une réponse inflammatoire très importante en dehors des pics infectieux et conduisent à de nombreuses divergences dans la communauté scientifique.

Cependant, l'inflammation pulmonaire chronique est une caractéristique physiopathologique inévitable pour les patients atteints de mucoviscidose.

Dans un contexte sain, la réponse inflammatoire se compose d'un élément déclencheur, d'un pic d'exacerbation et d'un retour à la normale. Dans le cas de la mucoviscidose, ce schéma n'est plus respecté. La réponse inflammatoire ne retrouve pas un état initial et les concentrations en cytokines pro-inflammatoires ne diminuent pas (214). Cependant les mécanismes sous-jacents à cette hyper-activation restent inconnus.

Récemment, notre groupe a montré que la protéine prion cellulaire (PrP^C) est localisée au niveau des jonctions cellulaires et a caractérisé son expression au sein des cellules épithéliales bronchiques humaines (215). Cette protéine est connue pour son implication dans l'inflammation cérébrale dans le contexte pathologique des maladies à prion et dans l'inflammation intestinale dans la maladie de Bowel. Ainsi PrP^C pourrait également être impliquée dans une maladie génétique inflammatoire telle que la mucoviscidose.

Chapitre III : La protéine Prion cellulaire

I. Histoire de la protéine PrP^C

I.1. Découverte des maladies à prions

En 1732, les premiers cas de tremblante du mouton également appelée "scrapie" du mouton (de l'anglais "tremblante") ont été décrits en Grande-Bretagne. Cette maladie fut nommée ainsi car les moutons développaient des troubles du comportement et notamment des tremblements en lien avec des atteintes du système nerveux central.

Ce n'est que plus tard, au début du 20^{ème} siècle, que des écrits ont été retrouvés concernant cette pathologie. En 1920, le neurologue allemand Hans Gerhard Creutzfeldt décrit pour la première fois des atteintes neurologiques similaires à la tremblante du mouton chez l'Homme. C'est en examinant le corps d'une jeune femme affectée par une maladie du système nerveux qu'il rédigea un article nommé "à propos d'une singulière atteinte du système nerveux central, avec formation de foyers de dégénérescence" (216). Parallèlement, à H. G. Creutzfeldt, un autre neurologue allemand, Alfons Jakob, publie en 1921 un article rapportant deux autres nouveaux cas de dégénérescence neuronale (217). Tous ces cas présentaient une maigreur extrême, une atteinte grave de l'état général et des troubles de coordination entraînant la mort. Les cerveaux des malades étaient tous criblés de trous faisant penser à une éponge, d'où le nom d'encéphalopathie spongiforme qui fut donné à cette maladie et qui plus tard prendra le nom des deux neurologues l'ayant découverte : Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ).

Parmi les étapes importantes de la compréhension de ces pathologies humaines et animales, les travaux des français Jean Cuillé et Paul Louis Chelle dans les années 1930 ont permis d'apporter les preuves de la transmission de la tremblante du mouton par l'injection d'homogénats de cerveaux de moutons malades à des moutons sains (218),(219). Le terme d'encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) fut alors utilisé. En 1956, les américains Vincent Zigas et Carleton Gajdusek décrivent une maladie touchant un peuple aborigène des Forêts de Nouvelle-Guinée, le kuru ou "peur de trembler" dans leur langue locale. Cette maladie se traduisait par une ataxie progressive évoluant vers un état

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

grabataire en six mois et une mort inéluctable après un ou deux ans ([220](#)),([221](#)),([222](#)).

Dans la même année, William J. Hadlow note de nombreuses similitudes anatomopathologiques entre le kuru et la tremblante du mouton et suggère l'hypothèse que le kuru serait également causé par un agent infectieux ([223](#)). Par la suite, les recherches pour l'identification de cet agent infectieux se poursuivirent, le groupe de Carleton Gajdusek démontra le caractère transmissible du kuru aux chimpanzés ([224](#)). Puis, l'hypothèse d'un agent infectieux ou virus responsable de cette maladie, toujours invisible au microscope électronique, fut remis en question puisqu'en 1967 l'anglais Thykave Alper montre que l'irradiation par des rayons ultraviolets, un procédé connu pour détruire les acides nucléiques et par conséquent les virus, est totalement inefficace pour prévenir la transmission de la maladie par des tissus cérébraux infectés ([225](#)). Par ailleurs, cet agent présentait une étonnante résistance à de puissants antiseptiques, comme le formol, mais aussi à la forte chaleur et à la dessiccation par lyophilisation. John Stanley Griffith propose alors l'hypothèse d'une protéine unique ([226](#)), un nouveau type d'agent infectieux qui remet en cause tous les dogmes de l'infectiologie à l'époque.

Ces résultats furent confirmés par le radiobiologiste français Raymond Latarjet en 1970 qui montre de nouveau la résistance de l'agent à des rayonnements ultraviolets (UV) de 250nm, longueur d'onde caractéristique de la destruction des acides nucléiques et qui met en évidence la sensibilité de l'agent aux rayonnements UV de 280 nm, une longueur d'onde qui cette fois est caractéristique de la dégradation des protéines ([227](#)).

I.2. Identification de l'agent infectieux responsable de la transmission et de la propagation de la maladie : la protéine prion

Cet agent infectieux n'était donc ni un virus, ni une bactérie mais une protéine infectieuse. C'est ce que le groupe de Stanley Ben Prusiner s'efforça de mettre en évidence entre les années 1980 et 1990, puisqu'ils furent les premiers à purifier l'agent de la tremblante et à le décrire comme une particule protéique infectieuse d'où le terme de Prion pour "PROteinaceous INfectious particle" ([228](#)). Les travaux de Prusiner et la théorie d'un agent infectieux de nature protéique capable de se répliquer sans porter d'information génétique sont très vite décriés et la

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

communauté scientifique reste sceptique, au point de refuser les publications scientifiques du chercheur.

Parallèlement, Alan G. Dickinson un généticien, mène ses recherches sur l'agent infectieux de la tremblante et propose quant à lui la théorie du virion où il suggère la présence d'un minuscule acide nucléique (comme les viroïdes, des ARN monocaténares circulaires retrouvés chez les plantes) qui serait associé et protégé par la protéine prion (229). Cette deuxième théorie permet alors de concilier les deux hypothèses de l'étiologie des maladies à prion. Plusieurs recherches sont menées dans le but d'identifier des liens entre les données connues pointant la nature protéique de l'agent infectieux avec les connaissances sur les agents infectieux traditionnels (230),(231).

Dès les années 1980, des coupes de cerveaux de patients atteints d'EST sont examinées au microscope électronique et les premières plaques amyloïdes constituées de fibrilles sont observées. Ces plaques amyloïdes seront ensuite décrites par P.A. Merz dans des cerveaux de souris inoculées avec l'agent de la tremblante et il les qualifia de "Scrapie-Associated-Fibrils" (SAF). Ce sont des fibrilles constituées de deux ou quatre filaments et qui sont morphologiquement différentes des fibrilles cérébrales normales, des microtubules, des neurofilaments et des filaments gliaux (232). Prusiner montrera par la suite que ces fibrilles sont composées de la protéine prion (233). Cette découverte suggère alors que la présence de ces fibrilles dans lesquelles s'accumule la protéine prion pourrait être à l'origine des maladies à prions et plus largement des lésions cérébrales.

La théorie de la protéine infectieuse fut alors de plus en plus acceptée, mais cependant les origines d'un tel agent infectieux restaient totalement inconnues. Néanmoins, en se basant sur les règles irréfutables de génétique, une protéine, aussi atypique soit-elle est forcément codée par un gène, qu'elle qu'en soit son origine.

Ainsi, le groupe de Prusiner entreprit de réaliser le séquençage de ce gène afin d'en déduire la séquence codante de la protéine prion. Les résultats furent stupéfiants puisque la séquence identifiée correspondait à celle d'un gène cellulaire connu, codant une protéine de 253 acides aminés, très abondante dans la membrane cytoplasmique des neurones (234),(235),(236). Ce gène fut nommé

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

PRNP (prion protein). A partir de cerveaux de hamsters infectés, la protéine prion fut pour la première fois observée par électrophorèse avec une bande protéique entre 27 et 30 kDa, ce qui lui vaudra le nom de PrP 27-30 pendant de nombreuses années.

Par la suite, des expériences de clonage ont permis de mettre en évidence la présence de l'ARNm de la protéine prion au sein de cerveaux sains et infectés par la tremblante. De plus, cette même séquence fut identifiée chez la souris et d'autres espèces, suggérant un fort degré de conservation.

La théorie d'un agent infectieux "conventionnel" fut alors totalement écartée.

II. Pathogénicité de PrP^C associée aux Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles

II.1. Les différents types d'EST

Les maladies à prions ou EST se différencient en deux grandes catégories, Les EST animales et les EST humaines plus souvent appelées Maladie de Creutzfeldt Jakob. Néanmoins, leurs caractéristiques générales sont comparables et la dégénérescence neuronale causée par la maladie est observée dans les deux cas. Parmi les EST humaines, il en existe différentes formes :

II.1.1. Les formes sporadiques

Ces formes représentent les maladies à prions les plus fréquentes mais restent néanmoins rares. Le taux de mortalité est d'environ 1,5 cas par million d'individu et par an dans les pays développés. Cependant, les causes de cette forme sporadique de MCJ (MCJs) sont toujours inconnues.

Les différents paramètres épidémiologiques qui ont pu être rapportés au cours de ces dernières années suggèrent fortement que la MCJs ne provient pas d'une source infectieuse. L'origine de la MCJs proviendrait, selon l'hypothèse privilégiée, d'une conversion aléatoire de la protéine PrP^C en PrP^{Sc} (Protéine prion Scrapie) infectieuse qui s'accumulerait par autocatalyse aboutissant à la mort neuronale et qui permettrait le développement des différents symptômes cliniques de la MCJ.

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

Une étude britannique a montré que les MCJs étaient liées à l'âge puisqu'en Grande-Bretagne elle touche principalement des individus âgés de 50 à 90 ans. Cette observation concorde avec l'origine sporadique de la MCJs et la dégénérescence neuronale liée à l'âge qui est un facteur de risque dans la majorité des pathologies associées à une dégénérescence neuronale. Néanmoins de nombreuses études ont tenté de montrer que tous les cas de MCJs avaient une origine infectieuse iatrogénique ou zoonotique mais sans résultats. Aucun nouveau facteur de risque n'a pu être mis en évidence hormis l'âge du patient.

Des études génétiques ont alors été menées dans le but d'expliquer l'apparition des MCJs. C'est ainsi que des modifications du génotype du codon 129 du gène *PRNP* ont été identifiées chez les sujets malades. Le codon ATG codant une méthionine est substitué par le codon GTG codant une valine (237). Un génotype homozygote pour la valine 129 conférerait une susceptibilité plus importante à développer la maladie. Il a été montré une hétérogénéité des symptômes des MCJs entre les patients qui s'explique notamment par le polymorphisme du codon 129 du gène *PRNP* et le type de dépôt de protéine prion dans le cerveau. Ces différentes variations ont permis de diviser les MCJs en trois grandes classes et six sous-types. Cependant, ce polymorphisme du codon 129 du gène *PRNP* ne permet pas d'expliquer le déclenchement de la MCJs. Ainsi, une étude européenne a été menée dans le but d'identifier d'autres facteurs génétiques en parallèle des mutations du gène *PRNP*. Les résultats de cette étude ont montré des risques génétiques au niveau des gènes *PLCXD3* (phosphatidyl-inositol specific phospholipase c x domain containing 3) et *GRM8* (glutamate receptor metabotropic 8), de plus, le polymorphisme de la région régulatrice du gène *PRNP* semble être impliqué dans le développement de la MCJs. Cependant, les causes précises de l'apparition de la MCJs restent méconnues et d'autres études sont en cours.

II.1.2. Les formes génétiques

Ces formes sont plus rares et représentent seulement 10% des maladies à prions. Elle sont causées par des modifications du gène *PRNP* qui correspondent à des mutations ou des insertions nucléotidiques (238) (Figure 17). La transmission de la maladie est autosomique et dominante avec une pénétrance variable (certain individu possède le génotype à risque mais ne développe pas la maladie).

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

Ces formes génétiques de la MCJ sont classées en trois sous-types selon le type de l'anomalie génétique, des signes cliniques, de l'évolution des symptômes et de la neuropathologie induite :

- Les MCJ génétiques ou MCJ familiale (MCJf)
- Le syndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS)
- L'insomnie fatale familiale (IFF)

L'un des problèmes majeurs dans les MCJ génétiques est l'histoire familiale, qui dans 50% des cas n'est pas connue et complique le diagnostic. L'étude et la recherche de mutations dans le gène *PRNP*, qui ne sont pas systématiquement effectuées, prend alors toute son importance (The Euro CJD Group, 2001).

Les différentes formes de MCJ génétiques se distinguent par la localisation de la mutation sur le gène *PRNP*. En effet, dans les MCJf les mutations se situent sur les codons 200, 178, 180, 210, 232, 196, 203 ou 211 et les insertions de 1 à 9 nucléotides se trouvent entre les codons 51 et 91 dans la partie N-terminale de *PRNP* (Figure 13). La mutation sur le codon 200 est la plus fréquente en France et les symptômes induits par celle-ci sont comparables à ceux observés dans les MCJs.

Le syndrome de GSS se caractérise par des mutations au niveau des codons 102 et 117 et ses particularités cliniques, évolutives et neuropathologiques.

Enfin, l'IFF est associée uniquement aux mutations sur le codon 178 additionné du codon 129 codant pour une méthionine sur le même allèle. Cette forme génétique de la MCJ se caractérise par une insomnie rebelle (rêves et hallucinations), des troubles végétatifs (perte des rythmes circadiens, hyperactivité sympathique), des difficultés motrices, une démence tardive et un électroencéphalogramme de sommeil caractérisé par une disparition de l'activité delta, des fuseaux de sommeil, des complexes K et des phases anormales de sommeil paradoxal. De manière générale, les lésions neuropathologiques sont localisées dans le thalamus (noyaux antérieur et dorsomédian).

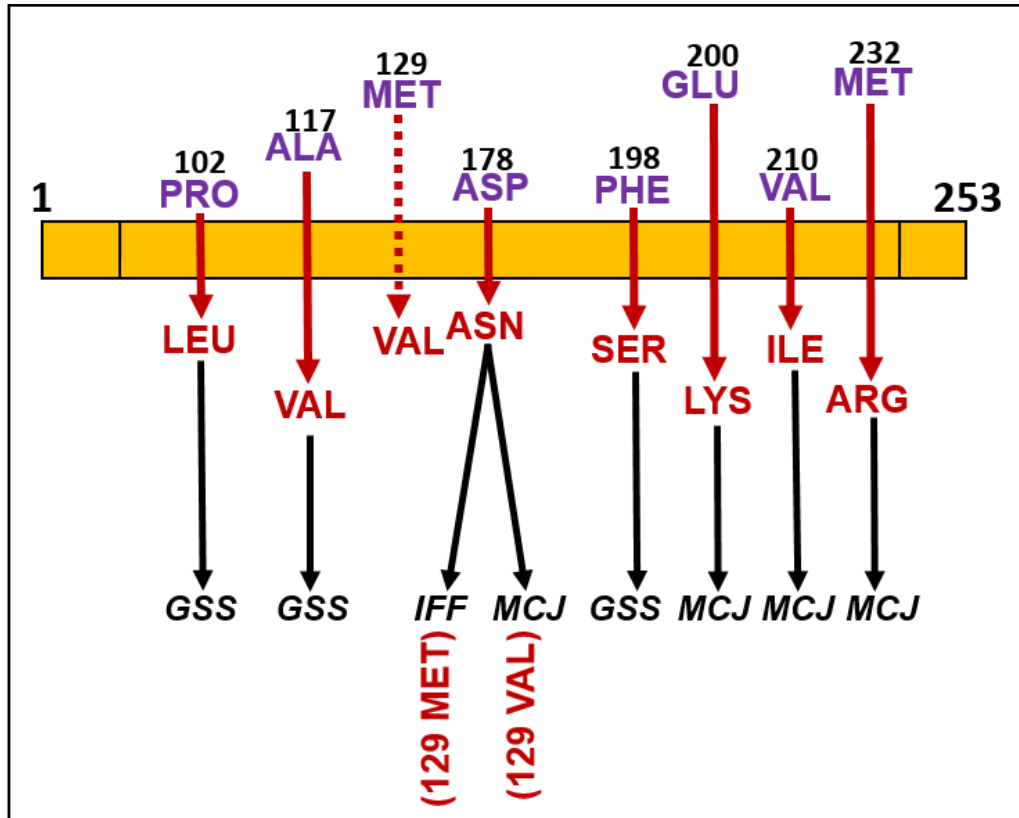


Figure 17 : Mutations du gène *PRNP* associées aux différentes EST génétiques. GSS : Syndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, IFF : Insomnie Fatale Familiale, MCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob. Schéma adapté de "Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. Weissmann C. *J.Biol.Chem.* 274-1, p 3-6. 1999".

II.1.3. Les formes acquises ou par transmission infectieuse

Les formes acquises ou infectieuses de MCJ sont désignées lorsque le prion infectieux ou PrP^{Scrapie} a été transmis selon deux voies :

- Proximité cérébrale (lors de greffes)
- Périphérique (par voie orale ou par injection)

Le premier cas de MCJ acquise par proximité cérébrale fut identifié en 1974. Environ 18 mois après une greffe de cornée la MCJ se développa, et plus tard le greffon de cornée fut identifié comme porteur de la MCJ (239),(240). Par la suite d'autres cas furent identifiés et notamment après des interventions avec des instruments médicaux mal décontaminés ayant été utilisés sur des patients infectés (241).

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

Enfin, la forme de MCJ acquise la plus connue est la variante de la MCJ (vMCJ) ou familièrement appelée "maladie de la vache folle" qui s'est faite connaître du grand public dans les années 1990 avec de la viande bovine contaminée par l'ESB (Encéphalopathie Spongiforme Bovine) importée d'Angleterre et qui avait été consommée partout en Europe, entraînant la contamination et le décès de plusieurs centaines de personnes. L'épidémie d'ESB est apparue en 1985 en Grande Bretagne et son amplification s'est produite via le recyclage des produits d'abattoirs en farines alimentaires destinées aux ruminants qui furent vendues partout en Europe aux éleveurs. Le passage inter-espèce de l'agent infectieux a été largement étudié et approuvé mais les mécanismes précis de transmissions restent encore inconnus. Néanmoins, certaines études ont montré que la transmission de la vMCJ était également possible par voie sanguine (242),(243). La durée d'incubation étant très variable d'un individu à l'autre, il est difficile de définir un temps d'incubation précis. Cependant, il semblerait que le profil génétique ait un impact dans le développement des vMCJ par voie orale. En effet, le profil génétique, en terme d'acide aminé, du codon 129 du gène *PRNP* analysé chez les patients est homozygote pour la méthionine (Met/Met) alors que ce profil génétique est retrouvé chez seulement 40% de la population générale (244),(245),(246). Des recherches sont actuellement en cours afin de déterminer si un profil génétique différent permettrait d'être protégé contre la propagation du prion infectieux. Il existe cependant quelques cas recensés chaque année dans la population qui s'expliquent par la longue période d'incubation durant laquelle se développe la vMCJ.

II.2. Les traitements et perspectives thérapeutiques

Les maladies à prions sont actuellement incurables et il n'existe aucun traitement médicamenteux efficace. Bien qu'étant une pathologie rare, l'issue est toujours fatale. Il est alors primordial de rechercher des cibles thérapeutiques dans le but de développer des traitements.

Concernant la recherche de traitements, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont été menées dans le but de tester des molécules antivirales, antibiotiques, antifongiques, immunomodulatrices, hormonales, antimitotiques et antiparasitaires sur des cellules ou des animaux infectés. Certaines molécules, telles que les polyanions (bloquants du système réticulo-endothélial),

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

l'amphotéricine B (antifongique), la dapsonne (antibiotique) ou les anthracyclines (anticancéreux naturels), ont montré des effets dans le retardement de l'apparition des signes cliniques chez l'animal mais sans avoir d'action sur le développement de la maladie.

La quinacrine ou mépacrine (antiprotozoaire) s'était montrée efficace *in vitro* sur des modèles cellulaires (247),(248) et a ainsi fait l'objet d'essais cliniques en Grande-Bretagne et aux Etats-Unis. Malheureusement les résultats de ces tests en double aveugle n'ont pas permis de conclure sur l'efficacité de cette molécule sur des patients atteints de MCJ (249), probablement car la molécule est administrée trop longtemps après l'initiation du développement de la maladie, en raison du diagnostic actuel trop tardif.

D'autres études ont montré que les tétracyclines, et plus particulièrement la doxycycline, auraient une activité anti-prion intéressante. La doxycycline serait capable d'interagir avec la protéine PrP^{Sc} anormale issue de patient afin de rétablir sa sensibilité aux protéases, de réduire les titres infectieux de PrP^{Sc} tissulaire et d'augmenter la survie de rongeurs infectés expérimentalement par voie intracérébrale ou périphérique. Ces différents résultats prometteurs ainsi que des résultats rétrospectifs issus de traitements compassionnels à la doxycycline montrant un allongement significatif de la survie des patients ont conduit une équipe italo-française à lancer des tests cliniques en double aveugle sur 121 patients atteints de MCJ sporadique ou génétique avec une dose administrée quotidiennement de 100mg de doxycycline (250). Malheureusement, cette étude clinique n'a pas permis de révéler une efficacité significative de la molécule par rapport au groupe de patients ayant reçu un placebo.

III. Physiologie de PrP^C

III.1. Le gène *PRNP*

La protéine prion cellulaire ainsi que son isoforme pathologique PrP^{Sc} sont codées par le gène *PRNP* d'environ 15kb localisé en position 12 sur le petit bras du chromosome 20 humain (Gene ID : 5621). Chez la souris, le gène *Prnp* se situe sur le chromosome 2 en position 6 (Gene ID : 19122). C'est un gène très conservé avec un degré d'homologie d'environ 90% chez les mammifères, 70% chez les

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

marsupiaux et 30% chez le poulet avec un cadre de lecture ORF (Open Reading Frame) situé au sein d'un seul exon (236),(251),(252). Chez l'homme, la partie codante du gène est constituée de deux exons de 760pb, tandis que chez la souris la partie codante comporte quatre exons. Le promoteur du gène *PRNP* ne contient pas de TATA box, en revanche il possède un motif de trois répétitions d'une séquence riche en G-C : GCCCCGCC (253) semblable aux sites de liaisons Sp1 (254) retrouvés dans les gènes de ménage. De plus, il a été montré que le gène *PRNP* comporte une boîte CCAAT en amont du promoteur ainsi que d'autres sites de liaison aux facteurs de transcriptions tels qu'Ap-1, Ap-2 (Activator protein-1/2) et Sp-1 (Specificity protein-1) (255). Le gène *PRNP* contient également des sites de fixation aux métaux MRE (Metal Responsive Element) en position 90, 1083 et 2537 (256),(257),(258).

III.2. Structure de la protéine PrP^C

La protéine PrP^C dont la structure tridimensionnelle a été déterminée par résonance magnétique nucléaire depuis 1996 (259),(260) est une sialoglycoprotéine de 253 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 37 kDa. La protéine PrP^C est composée de trois hélices α et deux feuillets β anti-parallèles avec une partie N-terminale extracellulaire et un domaine C-terminal membranaire. Ce domaine C-terminal COOH constitue l'ancre GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol) de la protéine PrP^C et permet son insertion dans la membrane. La conversion de PrP^C en PrP^{Sc} est caractérisée par une diminution en hélice α , une augmentation des feuillets β et la formation de plaques amyloïdes résultants de l'accumulation de PrP^{Sc}. La structure N-terminale de PrP^C (23-120) devient flexible et la partie C-terminale de PrP^C (121-231) forme un domaine globulaire avec trois hélices α et un feuillet β (261) (Figure 18).

Parmi les éléments importants de la protéine PrP^C, l'extrémité N-term contient un octapeptide PHGGGWGQ répété cinq fois qui permet la liaison des ions Cu²⁺ avec une grande affinité (262),(263) (Figure 18). Cette liaison induit alors un changement de conformation de l'extrémité N-term (264), néanmoins les effets de ce changement restent inconnus. L'extrémité C-term est constituée de deux sites de N-glycosylation qui permettent différents niveaux de glycosylation de la protéine avec une forme hyper-glycosylée, une forme intermédiaire et une forme non glycosylée. Entre ces deux extrémités, une région hydrophobe TMD a été

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

identifiée. Son rôle n'est pas encore connu mais cette région est très fortement conservée. Il semblerait que cette séquence soit impliquée dans la conversion pathologique de la forme PrP^C en PrP^{Sc} (265).

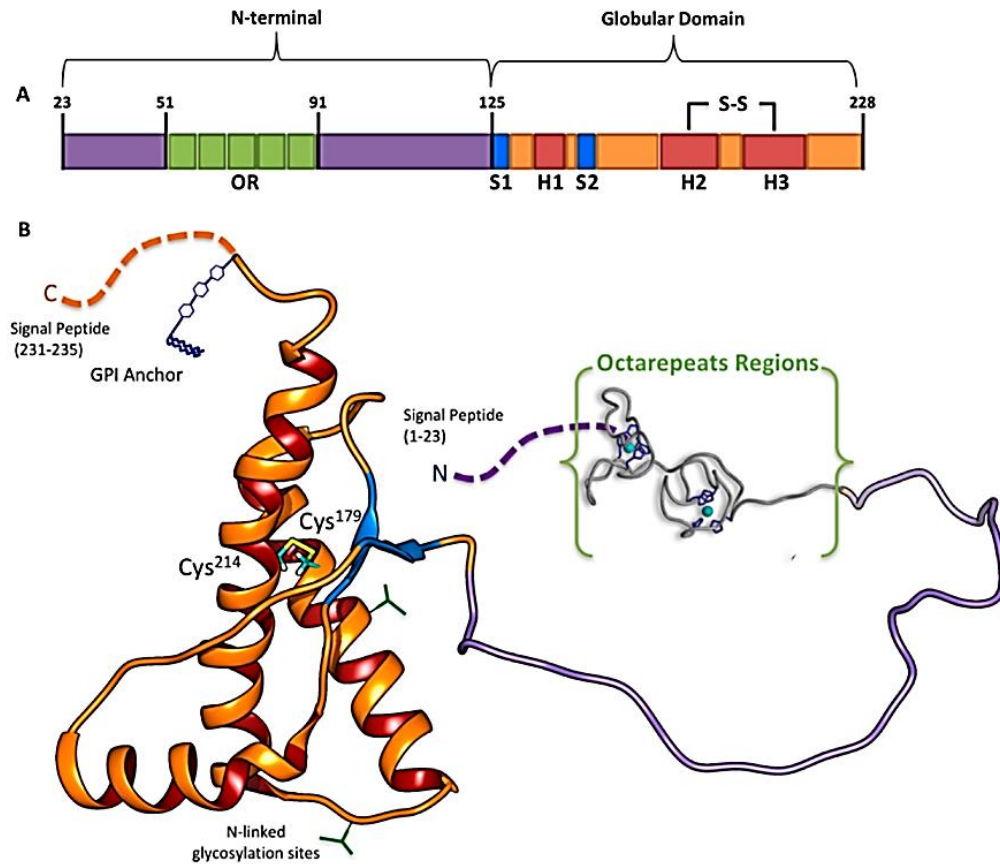


Figure 18 : (A) Schéma et (B) vue tridimensionnelle de PrP^C. OR: Octarepeats regions. D'après " Determinants of the Prion Protein N-Terminus and Its Adducts with Copper Ions " Sánchez-López, C. et al. Structural. Int. J. Mol. Sci. 20-1. 2019.

Il a également été montré que la structure de l'ARNm de PrP^C contient des pseudonœuds (266). Ces structures particulières de l'ARN se forment à partir de structure en tige et boucle (267) et lorsqu'elles sont retrouvées dans des ARNm, elles induisent un décalage programmé du cadre de lecture par le ribosome. Ces mécanismes sont souvent utilisés par les virus pour leur permettre la traduction de certaines protéines.

La structure de la protéine PrP^C est un élément clé dans le déclenchement des EST. En effet, un évènement encore inconnu à ce jour, entraîne la conversion post-traductionnelle de la forme physiologique PrP^C dans une isoforme pathologique PrP^{Sc} qui se produit probablement au niveau de la membrane plasmique ou le long

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

d'une voie endocytaire menant aux lysosomes (268). Cette isoforme acquière également des paramètres physico-chimiques propres : insoluble dans les détergents et résistante aux protéases (269). La protéine PrP^{Sc} est le vecteur de propagation des maladies à prion. En effet, l'hypothèse la plus pertinente de nos jours suggère qu'une protéine PrP^{Sc} peut convertir d'autres protéines PrP^C en PrP^{Sc}

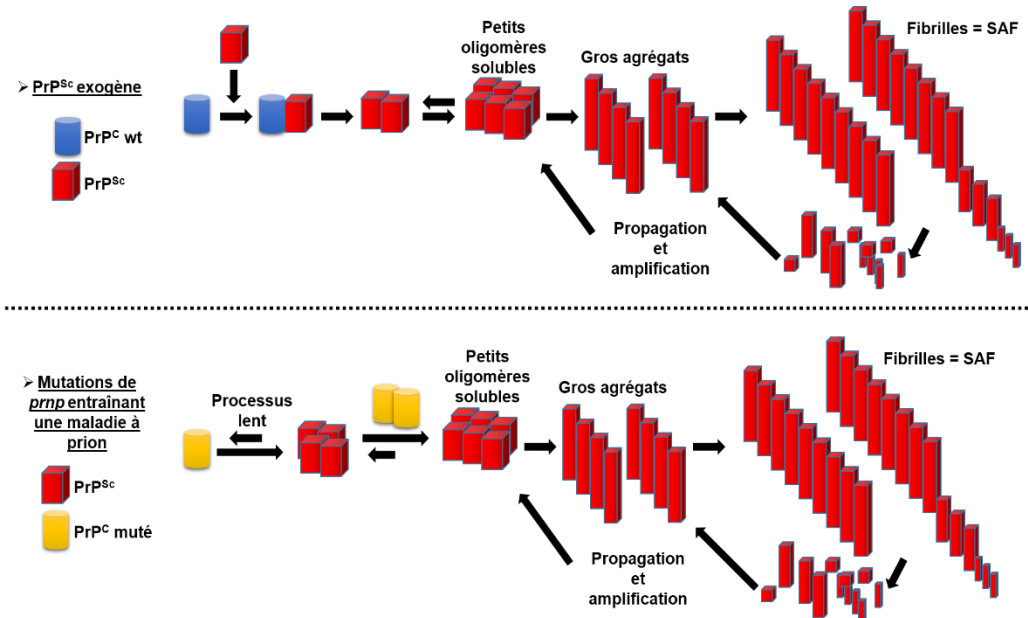


Figure 19 : Mécanismes proposés pour le développement des EST acquises et génétiques. SAF : Scrapie-Associated-Fibrils. Schéma adapté de "From prion diseases to prion-like propagation mechanisms of neurodegenerative diseases. Acquatella-Tran Van Ba I. et al. Int. J. Cell. Biol. 975832. 2013".

par un mécanisme d'interaction et/ou autocatalytique (Figure 19). La conséquence de cette conversion incontrôlée mène à une accumulation de la forme PrP^{Sc} dans le système nerveux sous forme de plaques amyloïdes qui entraînent l'apoptose des cellules neuronales et ainsi le développement de troubles cérébraux.

Il a aussi été montré qu'à pH acide, le domaine C-terminal de la protéine PrP^C (le seul segment de PrP^C avec une structure tertiaire définie) peut adopter une autre conformation avec des caractéristiques spectrales d'une protéine riche en feuillets β . Ainsi, les différences structurelles entre les sous-unités de PrP^C et PrP^{Sc} ne peuvent être limitées qu'au segment 90–120 de la protéine et que le domaine C-terminal de PrP^C (121–231) peut également subir un changement de conformation lors de la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} (269).

III.3.Synthèse, maturation, recyclage et dégradation

Comme la plupart des protéines membranaires, PrP^C est synthétisée dans le RE puis transite par l'appareil de Golgi avant d'être exportée vers la membrane à la surface des cellules. Au cours de sa biosynthèse dans le RER, la protéine PrP^C immature subit différentes modifications :

Le clivage du peptide signal en position N-term permettant la translocation de PrP^C dans le RER ([270](#)).

L'addition de chaînes N-glycosylées sur deux sites ([271](#)). Ces chaînes initialement ajoutées dans le RER sont riches en mannose et sont sensibles à la digestion par l'endoglycosidase H. Elles sont ensuite modifiées dans l'appareil de Golgi pour obtenir des chaînes complexes contenant de l'acide sialique et résistantes à l'endoglycosidase H ([272](#)). Il a été montré que la mutation des deux sites consensus de N-glycosylation dans la protéine PrP^C murine provoque un repliement anormal de la protéine et son accumulation dans un compartiment à proximité de l'appareil de Golgi ([273](#)),([274](#)). Cependant, une N-glycosylation correcte n'est pas indispensable pour le transport biosynthétique de PrP^C car en présence de tunicamycine, un inhibiteur de la glycosylation, un nombre important de protéines est toujours présent à la surface des cellules ([273](#)). PrP^C a donc une tendance intrinsèque à adopter certaines caractéristiques analogues à PrP^{Sc} au cours de sa maturation conformationnelle normale, néanmoins les chaînes N-glycosylées protègent contre ce changement. Ce phénomène pourrait expliquer que différentes souches de prions présentent parfois des profils distincts de glycosylation ([275](#)),([276](#)).

La formation d'un pont disulfure ([277](#)).

L'ajout de l'ancre GPI après clivage du segment C-term hydrophobe ([278](#)). Cette ancre glycolipidique se constitue d'un résidu éthanolamine lié par un amide à l'acide aminé C-terminal, de trois résidus de mannose, d'un résidu de glucosamine non acétylé et d'une molécule de phosphatidyl-inositol qui est incorporée dans la feuille externe de la bicouche lipidique ([279](#)).

Dans un cadre métabolique normal, la protéine PrP^C est ensuite soumise à différents clivages post-traductionnels. Le premier se situe au sein de l'ancre GPI

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

et libère la chaîne polypeptidique dans le milieu extracellulaire (280). Le rôle de ce premier clivage n'est pas connu mais par homologie avec d'autres protéines à ancre GPI qui subissent un clivage post-traductionnel, il semblerait qu'une phospholipase membranaire soit responsable de cet événement (281). Le second clivage est un clivage protéolytique agissant au niveau du segment hydrophobe et qui aboutit à la libération d'un peptide de 10 kDa. Ce peptide pourrait avoir un rôle de ligand biologique, d'autant que ce clivage est très conservé chez différentes espèces. Ce second clivage se produit au sein de vésicules d'endocytose (279) et d'autres études suggèrent que les domaines riches en cholestérol de la membrane cellulaire sont impliqués dans ce phénomène (282).

Cependant, ces clivages se produisent de manière très lente par rapport au temps de demi-vie de la protéine PrP^C et leurs rôles physiologiques respectifs n'ont pas été identifiés.

D'autres clivages de la protéine PrP^C, en condition normale, ont pu être mis en évidence. Notamment les clivages alpha et bêta (283) dont les sites de clivage se situent en position 111-112 et 96 respectivement. Ceci génère différents peptides de PrP^C appelés C1 et C2 pour les fragments résultant de la partie C-term et N1 et N2 pour les fragments provenant de la partie N-term (Figure 20). Les rôles physiologiques et/ou pathologiques de ces clivages sont encore méconnus mais ces études ont permis de révéler un potentiel rôle de PrP^C comme senseur de stress et particulièrement du stress oxydatif associé au cuivre (284).

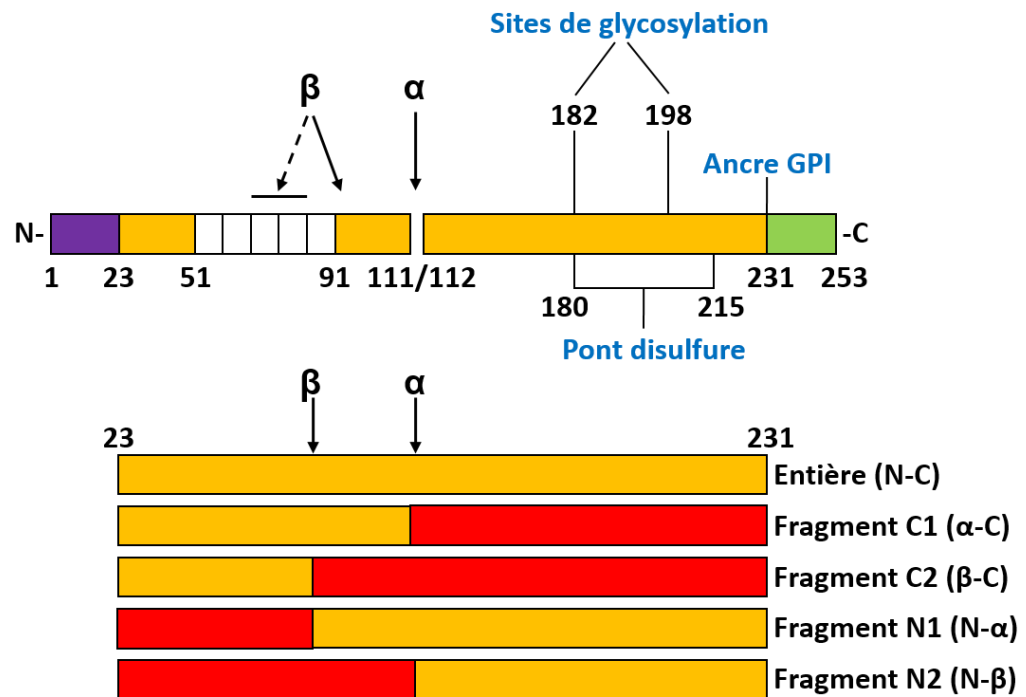


Figure 20 : Structure simplifiée de la protéine PrP^C et des différents fragments obtenus après clivage. Schéma adapté de "Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. Taraboulos A. et al. J. cell biol. 129-1. p 121-132. 1995".

Concernant, le trafic cellulaire et le recyclage de la protéine PrP^C, dès les années 1990, le groupe de David A. Harris montre que lorsque la protéine PrP^C est exportée à la membrane des cellules, elle subit constitutivement des cycles entre la membrane cellulaire et des vésicules d'endocytose (285) avec un temps de transit d'environ 60 minutes. Cette transition s'effectue via des clathrines, protéines membranaires permettant l'invagination de la membrane plasmique et la formation de vésicules d'endocytoses intracellulaires (286). Cependant, ce mécanisme d'endocytose est surprenant puisque les protéines endocytosées par les clathrines possèdent souvent un motif tyrosine dans leur domaine cytoplasmique (287) et la protéine PrP^C ne contient pas de domaine cytoplasmique. Ainsi, il a été mis en évidence que PrP^C peut également être endocytosée par des cavéolines membranaires (288). Près de 95% des protéines internalisées retournent à la membrane sans modification, les autres sont protéolysées par le second clivage post-traductionnel précédemment décrit ci-dessus dans une région fortement conservée de l'extrémité N-term.

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

Enfin, lorsque des protéines PrP^C ne passent pas le système de contrôle qualité cellulaire du fait d'un repliement incorrect par exemple, elles s'accumulent dans la lumière du RE et sont ensuite prises en charge par le système de dégradation des protéines ERAD (Endoplasmic-Reticulum-Associated protein Degradation). Le système ERAD permet ainsi la translocation des protéines vers le cytosol où elles seront dégradées par le système ubiquitine/protéasome/ (289),(290).

III.4.Expression et localisation

La protéine PrP^C est une protéine cellulaire exprimée dans les neurones et les cellules gliales du cerveau et de la moelle épinière et également dans de nombreux tissus périphériques non neuronaux (291),(292). En effet, la protéine ainsi que l'ARNm de PrP^C ont été détectés dans la rate, les tissus lymphoïdes, les poumons, le cœur, les reins, les muscles squelettiques, l'utérus, les intestins, les glandes surrénales, les glandes parotides et les glandes mammaires et le placenta (293). L'ARNm de PrP^C est détectable très précocement au début de l'embryogénèse et sa concentration augmente au fur et à mesure du développement (294),(295).

La protéine PrP^C est principalement localisée à la surface des cellules, insérée dans la membrane cellulaire grâce à son ancre GPI. Néanmoins, il a été démontré que la forme infectieuse PrP^{Sc} est localisée dans le compartiment nucléaire (296). Par la suite, une étude a montré que certains mutants de la protéine PrP^C avaient une localisation presque exclusivement nucléaire (297). Une localisation mitochondriale a également été mise en évidence chez des souris transgéniques surexprimant PrP^C (298),(299).

III.5.Régulation

La transcription du gène *PRNP* est connue pour être modulée par la structure et la conformation spatiale de la chromatine (300). De plus, le gène *PRNP* comporte des sites de fixation potentiellement accessibles à de nombreux facteurs de transcription indiquant ainsi que l'expression de PrP^C est dépendante de facteurs cellulaires. En plus des facteurs Ap1, Ap2 et Sp1 précédemment identifiés pour réguler l'expression du gène *PRNP*, d'autres sites de fixation ont été identifiés dans la région 5' au sein du premier exon : MZF-1 (Myeloid Zinc Finger 1), MEF2, MyT1 (Myelin Transcription Factor 1), NFAT(Nuclear Factor of Activated T-cells), Bcl-6 (B-cell lymphoma protein 6), ZNF238 (Zinc

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

Finger protein 238), NEUROG1 (Neurogenin-1), EGR4 (Early Growth Response protein 4), Oct-1/Oct-2 (Organic cation transporter-1/2), NF-IL6 (Nuclear Factor for IL-6 expression), MyoD (Myoblast Determination protein), p53 (tumor protein 53), HSE (Heat Shock sequence Elements), MRE et MLS (HoloCytochrome C Synthase) (301),(302),(303),(304) (Figure 21).

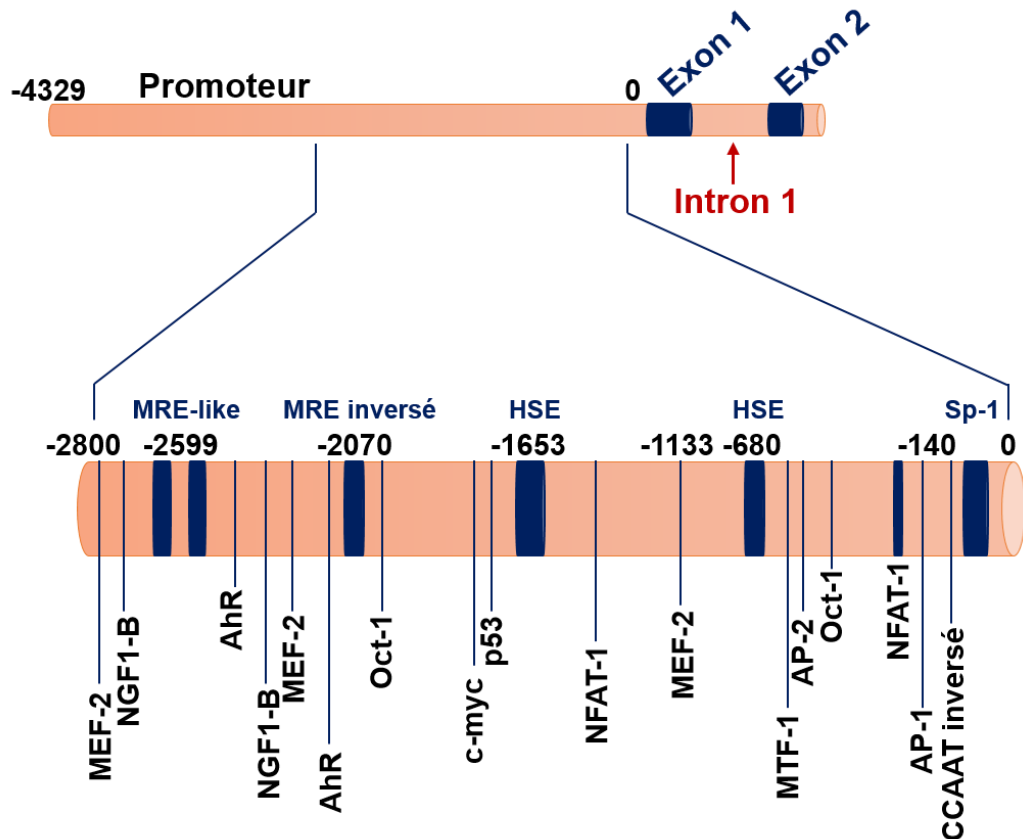


Figure 21 : Positions des sites de régulation du gène *PRNP* (liste non exhaustive). Schéma adapté de "Regulation of prion protein expression : a potential site for therapeutic intervention in the transmissible spongiform encephalopathies. Haigh C. L. et Brown D. R. IJBS 2-4. p 315-323. 2006".

La régulation de l'ARNm et de la protéine PrP^C est étroitement liée au développement. L'expression de l'ARNm murin de PrP^C a été détectée entre le 8^{ème} et le 9^{ème} jour embryonnaire au moment de la transition du métabolisme anaérobie vers un métabolisme aérobie (305) suggérant un rôle important de PrP^C dans le développement embryonnaire. Dans ce contexte, il a été montré que l'injection du facteur de croissance NGF (Nerve Growth Factor) dans le cerveau de nouveau-nés de hamsters induit une régulation positive de l'ARNm de PrP^C

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

ainsi qu'une augmentation de l'activité de la choline acétyltransférase de neurones cholinergiques sensibles au NGF (306). Aussi, la différenciation cellulaire de cellules tumorales de médullosurrénales induite par le facteur NGF ou l'IL-6 s'accompagne d'une augmentation de l'expression de l'ARNm de PrP^C (307). Toutefois, il a été démontré que l'induction de PrP^C par le NGF dans des fibroblastes sans différenciation dépend d'effets contraires aux voies des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) ou de la PI3K (Phospho-inositide 3-kinase) ce qui indique que l'augmentation de PrP^C n'est pas une conséquence de la différenciation induite par le NGF (308).

De manière générale, il est admis que l'augmentation de l'expression de PrP^C est corrélée avec le développement cérébral et la différenciation neuronale mais ne semble pas être corrélée avec la différenciation des cellules gliales.

Le stress cellulaire module également l'expression de PrP^C. En effet, au sein de cellules de neuroblastome, l'augmentation de la protéine Hsp70, une protéine traduisant un stress cellulaire et particulièrement un choc thermique, induit une régulation positive de l'expression de PrP^C (309). L'oxygène hyperbare ainsi que l'hypoglycémie sont des exemples de stress qui induisent la régulation positive des gènes de PrP^C, de Hsp70 et de la voie JNK (c-Jun N-terminal kinases). Dans ce cas, l'activation du promoteur de *PRNP* dépend de la présence d'un ou plusieurs éléments de choc thermique dans sa séquence (310),(311), de manière similaire à ce qui est observé dans les cellules de neuroblastomes sujettes à des cycles d'hypoxie et d'oxygénation (312).

Apparentée aux stress cellulaires, la réponse inflammatoire induit également des régulations de l'expression de PrP^C. Les premières observations ont été faites à partir de peau et d'épithélium gastro-intestinaux enflammés où l'expression de PrP^C est régulée positivement (313),(314). De plus, une corrélation a été faite entre un statut redox déstabilisé et la présence de PrP^C (315). Néanmoins, la régulation de l'expression de PrP^C dans ces conditions reste peu connue. L'enjeu est de déterminer si ces situations de stress entraînent une augmentation de l'expression génique de PrP^C ou préviennent la dégradation de la protéine PrP^C.

La capacité de PrP^C à fixer le cuivre via son extrémité N-term avec une forte affinité est maintenant bien documentée (263),(316),(317) et il a été montré que

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

l'accumulation d'une forte charge cuprique entraîne la régulation positive de la protéine PrP^C (318). Notre groupe a confirmé cette régulation positive de PrP^C par le cuivre sur des cellules épithéliales bronchiques mais également sur des cellules placentaires et a montré que cette régulation n'était pas tissu-dépendante (215) (319). De plus, nous avons observé que des traitements avec d'autres métaux divalents capables de se lier à PrP^C comme le fer ou le zinc induisent également une régulation positive de PrP^C (données non publiées). Enfin, il a été montré que les réponses cellulaires de PrP^C face au cuivre mais aussi au cadmium dépendent de la présence de sites de fixation des métaux MRE dans la séquence de *PRNP*, sans que le facteur de transcription MTF-1 (Metal regulatory transcription factor 1) soit impliqué (304).

IV. Fonctions de PrP^C

Actuellement, les fonctions physiologiques précises de la protéine PrP^C sont peu décrites. Déterminer la physiologie de PrP^C dans des conditions normales reste un enjeu majeur puisqu'elle permettrait de comprendre comment survient la conversion pathologique de PrP^C en PrP^{Sc} et de lutter contre les EST, mais également de comprendre d'autres situations physio-pathologiques dans lesquelles PrP^C semble avoir un rôle. Néanmoins, certaines propriétés de la protéine ont pu être mises en évidence :

IV.1. Rôle neuroprotecteur

La protéine PrP^C est connue pour jouer le rôle de récepteur et s'associer avec la laminine via sa chaîne γ -1 (320). Les laminines sont des glycoprotéines hétérotrimériques qui constituent majoritairement la lame basale avec le collagène et connues pour avoir un rôle dans la prolifération, la différenciation, la migration et la mort cellulaire neuronale (321). Ces différents effets sont médiés via l'interaction de la laminine avec les intégrines. Cette interaction se caractérise par la formation et le développement de neurites, la migration des neurones, la régénération neuronale et axonale (322) et la prévention de la morte neuronale induite après injection d'acide kaïnique, molécule analogue au glutamate, convulsive et neurodégénérative (323). Il a été montré que le détachement des neurones de leurs substrats constitués de laminine était l'événement déterminant de la mort neuronale, caractéristique des crises de convulsion. Par la suite, une

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

étude a montré que des souris invalidées pour PrP^C étaient plus sensibles aux convulsions causées par trois agents convulsifs, dont l'acide kaïnique, ce qui suggère que l'absence de la protéine PrP^C rend les animaux plus sensibles à la mort neuronale en raison de la dégradation de la laminine (324). Cependant, l'absence de protéine PrP^C *in vivo* chez des souris transgéniques n'entraîne pas de modification dans le développement et la structure du cerveau et ne perturbe pas le comportement des souris ni leurs capacités cognitives (325).

Il a également été montré que la protéine PrP^C joue un rôle cytoprotecteur contre les stress endogènes et environnementaux qui activent les voies d'apoptoses neuronales (326). Cette observation a été confirmée dans différents modèles : i) dans des lignées cellulaires eucaryotes, PrP^C a la capacité de protéger les neurones de l'apoptose induite par le médiateur pro-apoptotique Bax (Bcl-2-associated X) (327), (328), ii) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, où l'expression hétérologue du Bax eucaryotique est létale, l'expression de la protéine PrP^C permet de contrer efficacement l'apoptose induite par Bax (329) et iii) chez différents modèles murins dont les séquences de *Prnp* ont été modifiées et/ou tronquées, les souris développent progressivement une neurodégénérescence fatale (330),(331), mais l'apport de protéines PrP^C endogènes permet de contrebalancer la neurodégénération et assure la survie des souris (332).

IV.2.Relation avec les métaux

Comme décrit précédemment, l'extrémité N-term de la protéine PrP^C contient une répétition de l'octapeptide PHGGSWGQ qui lui permet de fixer différents métaux divalents comme le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn) ou encore le nickel (Ni) mais avec une plus grande affinité pour le cuivre (262),(263),(264). L'interaction avec ces différents métaux entraîne des changements de conformation de la structure N-term de PrP^C (333),(334),(335),(336). De plus, il a été montré que la séquence de l'octapeptide PHGGSWGQ est cruciale pour l'endocytose de la protéine PrP^C induite par les métaux. Cependant ces résultats ont été obtenus sur des modèles cellulaires sur-exprimant la protéine PrP^C. Dans un modèle où la protéine est exprimée d'une manière endogène, notre groupe a montré que le traitement par le cuivre augmente l'expression du PrP^C par insertion au niveau de la membrane plasmique (319) (215). Au niveau animal, l'invalidation

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

du gène *Prnp* dans un modèle murin cause des altérations dans l'homéostasie des métaux (337) (338).

Le cuivre est un métal essentiel pour le développement et la survie de l'organisme (339),(340). Dans la nature, le cuivre se trouve sous deux états d'oxydation et de par son statut redox, le cuivre assure la fonction de catalyseur pour différentes enzymes (cytochrome c, Cu/Zn Superoxyde Dismutase (SOD) etc...) (341),(342) ainsi que le transport des électrons dans différents systèmes biologiques (342),(343). De plus, le cuivre est un élément crucial dans la formation de l'hémoglobine ou encore pour le métabolisme des drogues. En conditions normales, le cuivre n'est presque jamais libre au sein de l'organisme car sa réactivité naturelle le rend sujet à des réactions toxiques via la réaction de Fenton et Haber-Weiss (344). La perturbation de l'homéostasie du cuivre conduit à des pathologies telles que les maladies de Wilson et Menkes (345),(346),(347),(348).

Il a été proposé que la surexpression de PrP^C entraînerait une fixation plus élevée du cuivre, suggérant ainsi que la protéine PrP^C pourrait jouer le rôle d'un transporteur membranaire du cuivre au sein de la cellule (349),(350). A l'inverse, l'addition de cuivre induit une régulation positive de l'expression de PrP^C (318). D'autres études ont suggéré que le cuivre aurait un rôle dans le développement des EST. En effet, dans certaines conditions, le cuivre a la capacité de convertir PrP^C dans une forme résistante à la protéinase K et insoluble dans les détergents (351) et inhibe la formation de fibrilles, agrégats de PrP^{Sc} caractéristiques des EST (352).

Concernant le manganèse, c'est un des métaux les plus abondants sur Terre qui existe sous onze états d'oxydation, ce qui le rend capable de participer à de nombreux processus physiologiques tels que la coagulation ou la production d'ATP (353). C'est également un élément clé pour la superoxyde dismutase à manganèse qui permet de détoxifier les ROS mitochondriaux (354). En revanche, une accumulation de manganèse dans les mitochondries inhibe les complexes mitochondriaux I et II et provoque un dysfonctionnement du transport des électrons au sein de la chaîne mitochondriale (355),(356). L'arrêt de la chaîne respiratoire conduit à l'augmentation de l'oxygène dans le cytoplasme, ce qui génère la production de ROS et ainsi le stress oxydatif causé par les ROS entraîne l'apoptose de nombreux types cellulaires (357),(358),(359). Plusieurs études ont

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

montré que le stress oxydatif généré par le manganèse causait par la suite une activation des caspases 3 et 9 ainsi que la fragmentation de l'ADN (Acide Désoxyribonucléique) (360),(361). Dans ce contexte, des recherches ont permis de mettre en évidence que PrP^C peut lier le manganèse (362),(363) et que PrP^C jouerait un rôle protecteur contre le stress oxydatif induit par le manganèse (364).

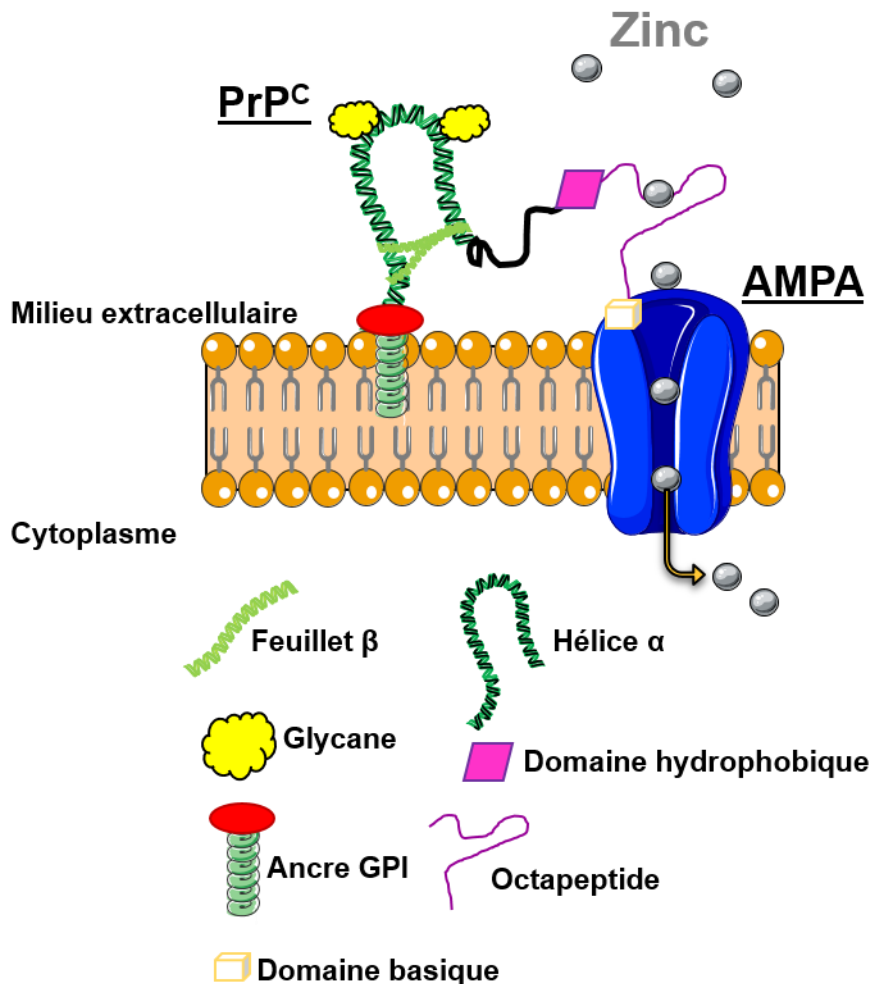


Figure 22 : Représentation de la coopération entre les protéines PrP^C et AMPA pour le transport intracérébral du zinc. Schéma adapté de "Neuronal zinc regulation and the prion protein. Watt N.T. et al. Prion 7-3. p 203–208. 2013".

Enfin, le zinc, un autre métal essentiel pour la vie et très abondant dans la nature, a aussi été largement étudié en relation avec la protéine PrP^C puisqu'au niveau cérébrale, la concentration extracellulaire en zinc est très supérieure à celle du cuivre. C'est l'oligoélément le plus abondant dans le cerveau qui permet notamment la neurotransmission entre les synapses en maintenant la plasticité synaptique et l'excitabilité neuronale. Pour assurer ses fonctions, le zinc doit être

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

finement régulé et des perturbations de l'homéostasie du zinc peuvent conduire à des désordres psychologiques. Il a été montré que la protéine PrP^C est capable de fixer le zinc (362) et comme pour le cuivre, cette interaction PrP^C-Zn entraîne l'endocytose de PrP^C (365). Il a également été montré que la protéine PrP^C participe au transport du zinc, comme un senseur, ainsi que par sa capacité à le capturer au niveau des fentes synaptiques et à le transférer au récepteur AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate) qui permettra son entrée dans la cellule (366) (Figure 22).

IV.3. Propriétés anti-oxydantes

Les liens étroits entre la protéine PrP^C et les métaux pouvant conduire à la génération de stress oxydatif suggèrent un rôle de PrP^C dans le stress oxydatif cellulaire. Une première étude suggérait une activité SOD-like à la protéine PrP^C au niveau cérébrale et lui conférait ainsi des propriétés anti-oxydantes (367). Cependant, cette activité qui avait été montrée *in vitro*, n'a pas été confirmée *in vivo* (368). Certaines études ont pourtant montré que des souris invalidées pour le gène *Prnp* présentaient une diminution de l'activité de la Cu/Zn SOD et une susceptibilité plus forte au stress oxydatif (369),(370) mais qui semble être compensée par une augmentation de la Mn SOD. Ainsi, l'implication de la protéine PrP^C dans le système anti-oxydatif de manière directe ou indirecte reste à déterminer.

IV.4. Localisation aux jonctions cellulaires

Une localisation intercellulaire de la protéine PrP^C en dehors du système nerveux a été montrée pour la première fois en 2003 sur des cellules épithéliales intestinales (371). En effet, plusieurs groupes se sont intéressés au système intestinal puisque lors d'une contamination orale par PrP^{Sc}, la propagation de l'infection se fait des intestins vers le système nerveux (372),(373). La protéine PrP^C est localisée au pôle apical des entérocytes (374) et également de manière latérale logée dans les domaines rafts riches en cholestérol (371). Au sein des complexes jonctionnels, PrP^C co-localise et interagit avec certaines protéines des jonctions adhérentes, la E-cadhérine et la kinase Src (Figure 23). Par la suite, les desmosomes ont aussi été identifiés comme étant des partenaires de PrP^C (375). Au sein des jonctions cellulaires intestinales, PrP^C présente deux types de distribution ; une localisation

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

nucléaire dans les cellules en cours de division cellulaire et une localisation intercellulaire dans les cellules polarisées et différenciées. L'inhibition de PrP^C dans les entérocytes humains entraîne une diminution de leurs propriétés de barrière en modifiant la localisation et l'expression des protéines de jonction et d'adhésion telles que l'E-cadhérine, la claudine-5 et l'occludine. Ainsi PrP^C aurait un rôle dans le mauvais adressage et la localisation des protéines jonctionnelles.

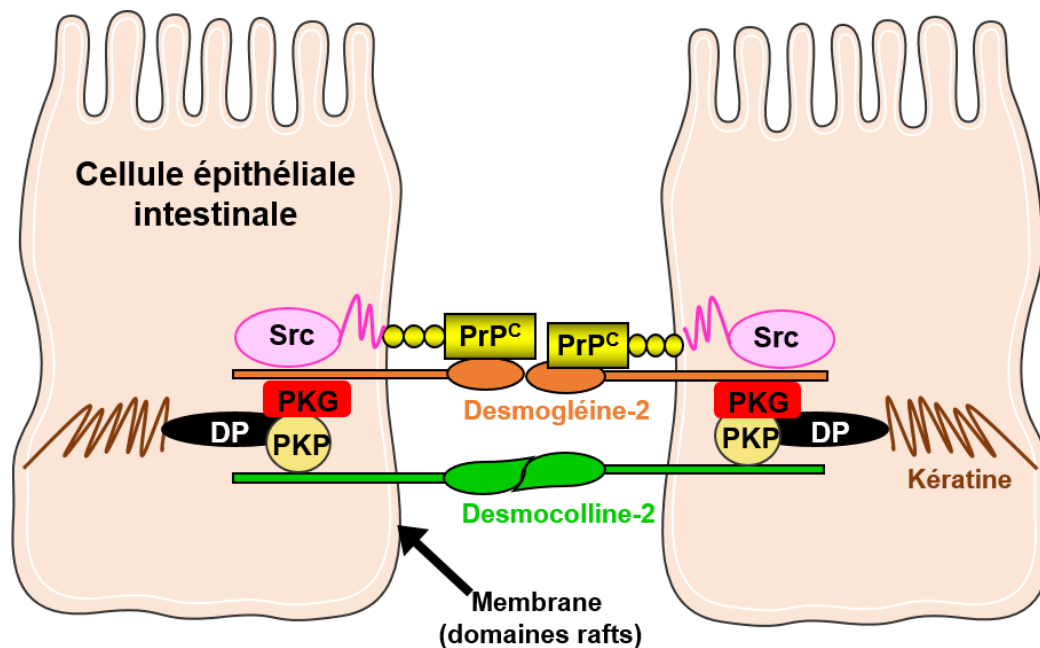


Figure 23 : Modèle proposé pour l'interaction de PrP^C et de la kinase Src au sein des desmosomes. PKG : Plakoglobine, PKP : Plakophiline, DP : Desmoplakine. Schéma adapté de "Roles of the cellular prion protein in the regulation of cell-cell junctions and barrier function. Petit C.S.V. et al. Tissue Barriers 1:2. e24377. 2013".

Notre groupe a montré que la protéine PrP^C est exprimée au niveau apical et latérale des cellules intestinales et rénales (374). Récemment, nous avons également montré que la protéine PrP^C est localisée au niveau des jonctions des cellules épithéliales bronchiques où elle participe au maintien des complexes jonctionnels et joue un rôle protecteur face au stress oxydant (215).

De plus, il a aussi été montré que cette protéine présente une localisation intercellulaire au niveau du système endothéliale avec un rôle dans l'adhésion cellulaire où elle interagit avec la protéine PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1) pour permettre la migration trans-endothéliale des monocytes (376).

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

En 2018, le groupe de Joan W. Berman s'est intéressé au rôle de PrP^C dans les jonctions cellulaires de cellules endothéliales microvasculaires du cerveau et à son expression après une exposition à des médiateurs pro-inflammatoires. Ils ont montré que des traitements au VEGF (Vascular Epithelial Growth Factor) ou au TNF- α induisent une diminution d'expression de PrP^C à la membrane plasmique, associée à une perte d'intégrité de la barrière jonctionnelle (377). D'autant plus que ces traitements sont également connus pour diminuer l'expression des protéines des jonctions serrées (claudine-5 et occludine) (378). Dans cette étude, les auteurs montrent que l'inactivation de PrP^C augmente la perméabilité de la monocouche endothéliale et diminue l'expression de la claudine-5 et de l'occludine. Ils proposent que la régulation négative de PrP^C induite par le VEGF et le TNF- α contribuerait directement aux modifications d'expression et d'adressage des protéines des jonctions serrées, affectant ainsi l'intégrité de la barrière endothéliale. La protéine PrP^C n'étant pas une protéine transmembranaire, il est possible qu'elle provoque ces changements par couplage avec d'autres protéines adaptatrices.

IV.5. Implication dans l'inflammation

L'implication de la protéine PrP^C dans les réponses inflammatoires neuronales a été démontrée. En effet, l'absence de PrP^C dans le système nerveux central exacerbe la réponse inflammatoire dans le cas d'encéphalomyélite auto-immune induite expérimentalement (379), et également dans le cas de lésions cérébrales (380), notamment lors de lésions ischémiques (381). De plus, une étude a montré que PrP^C est capable d'interagir avec le récepteur NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et d'inhiber son activité associée à la nociception (382) ce qui fait de PrP^C un important régulateur de la signalisation de la douleur.

Dans les tissus périphériques, la protéine PrP^C semble également être impliquée dans différents processus inflammatoires. Suite à l'administration systémique de LPS bactériens induisant une réponse inflammatoire, PrP^C a montré un lien dans la régulation de cytokines pro et anti-inflammatoires (383),(384). Il a aussi été observé que des souris qui surexpriment PrP^C sont plus résistantes aux colites induites expérimentalement que des souris invalidées pour le gène *Prnp*. De plus, ces souris invalidées présentent un profil inflammatoire exacerbé avec notamment

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

une augmentation des transcrits de cytokines pro-inflammatoires et une activation des protéines pro-apoptotiques qui amplifient la colite (385).

Du fait de la localisation de PrP^C au niveau des complexes jonctionnels des entérocytes, une étude s'est focalisée sur les perturbations de l'épithélium intestinal associées aux maladies inflammatoires des intestins telles que les maladies de Bowel et de Crohn (MBC) en lien avec la protéine PrP^C. Ces travaux ont permis de montrer que l'absence de PrP^C perturbe l'organisation des jonctions cellulaires intestinales et s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ces deux phénomènes participent ainsi à l'exacerbation de l'inflammation chronique observée dans les MBC. Finalement, cette étude suggère que le niveau d'expression de la protéine PrP^C n'est pas modifié dans les MBC, puisque le taux d'ARNm reste inchangé, mais qu'il y a une augmentation du cycle de recyclage de PrP^C induisant alors la déstabilisation des jonctions cellulaires (386).

La protéine PrP^C aurait également un rôle crucial dans l'activation de la voie pro-inflammatoire du TNF- α . La voie NF κ B comprend cinq facteurs de transcription inductibles : NF κ B-1 (p50), NF κ B-2 (p52), RelA (p65 : Transcription factor 65), RelB et c-Rel (387). Ces différentes protéines fonctionnent en dimères et régulent principalement la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, le recrutement des cellules immunitaires, l'expression de molécules d'adhésion et certaines enzymes inductibles comme la COX-2 (Cyclo-oxygénase-2) (388). Ces dimères sont maintenus inactifs par association avec des protéines kinases inhibitrices appartenant à la famille I κ B (Inhibitor of nuclear factor Kappa-B Kinase), constituée de I κ B- α , I κ B- β , I κ B ϵ et Bcl-3 (B-cell lymphoma protein 3) (389). Ainsi, en condition normale, les protéines I κ B présentes dans le cytoplasme inhibent NF κ B (390). Lors d'une stimulation inflammatoire l'activation de NF κ B est médiée par la phosphorylation des protéines I κ B qui sont ensuite polyubiquitinées et dégradées par des protéases, libérant ainsi la protéine NF κ B active. La forme active de NF κ B peut ensuite se transloquer et activer la transcription de ses gènes cibles. Bien que la dégradation des protéines I κ B reste une étape fondamentale pour l'activation de NF κ B, de nombreux autres mécanismes tels que l'ubiquitination, la sumoylation ou la phosphorylation sont impliqués dans la régulation de l'activité de transcription de NF κ B. De plus,

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

certaines enzymes semblent également contrôler ces processus. Ainsi, ces multiples mécanismes qui régulent étroitement l'activité de NF κ B permettent à cette voie de signalisation de participer à de nombreuses fonctions cellulaires vitales.

L'invalidation du gène *Prnp* entraîne des perturbations de l'expression des différentes protéines intermédiaires de la voie du TNF- α (IKK α/β (I κ B Kinase), p65 et JNK) tandis que l'expression de PrP^C améliore les réponses cellulaires au TNF- α en favorisant la production de médiateurs pro-inflammatoires(391).

IV.6.Implication dans les infections

Du fait de la localisation de la protéine PrP^C dans les domaines lipidiques rafts de la membrane plasmique, des études ont été menées dans le but de déterminer une éventuelle implication de PrP^C dans les infections bactériennes et notamment dans l'infiltration intracellulaire bactérienne. En effet, il a été montré que les domaines raft présents dans les membranes cellulaires participent à l'entrée de nombreuses espèces bactériennes dans la cellule (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Brucella spp* ou encore *Mycobacterium*) via les cavéolines qui internalisent les bactéries au sein de vésicules (392). Une première équipe a suggéré que la protéine PrP^C pourrait promouvoir les infections causées par la bactérie *Brucella* en améliorant l'internalisation de *Brucella* au sein des macrophages, un lieu de réplication stratégique pour cette bactérie (393). Par la suite, ce même groupe a suggéré une interaction directe ou indirecte entre PrP^C et *Brucella* via le récepteur membranaire bactérien Hsp60, une protéine chaperonne de la famille des Growth E.coli Large protein (GroEL) connue pour être activée lors d'invasions bactériennes (394). Cependant, un autre groupe n'a pas confirmé ces résultats et ne considère pas un rôle évident de PrP^C dans les infections bactériennes causées par *Brucella* (395).

Il a été décrit que l'extrémité N-term de PrP^C possède des propriétés antimicrobiennes. En effet, l'extrémité non structurée N-terminale de PrP^C est capable d'agir comme certains peptides antimicrobiens connus, en formant des pores dans la membrane bactérienne (396).

De plus, les fibrilles et agrégats de la protéine PrP^C ont été identifiés comme inducteur de la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β au travers de l'activation de NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3)

(397). De manière très intéressante, NLRP3 qui est un membre de l'inflammasome, ce complexe protéique oligomérique impliqué dans l'immunité innée et la réponse inflammatoire (398), est activé dans les infections bactériennes à PA via un facteur de virulence protéique, la piline (399). Lors d'infections cérébrales avec la souche *Mycobacterium bovis*, l'expression du gène *Prnp* est régulée à la hausse, ce qui conduirait à une diminution des facteurs pro-inflammatoires, une augmentation de l'apoptose des cellules infectées et permettrait ainsi à *M. bovis* d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (400).

Enfin, un rôle protecteur durant certaines infections virales a été proposé pour PrP^C par différentes études. Après infection par le virus de l'encéphalomyocardite B (inducteur d'encéphalites et de l'apoptose des cellules neuronales), les souris sauvages (comparées aux souris invalidées pour PrP^C) présentent une meilleure infiltration des cellules inflammatoires accompagnée d'une augmentation de l'activation des cellules microgliales (401), qui ont un rôle protecteur contre les lésions cérébrales (402). Puis, une autre étude a suggéré un rôle protecteur de la protéine PrP^C lors d'infection avec le virus Influenza A (403). Ce rôle a été attribué à l'octapeptide de PrP^C permettant la fixation du cuivre, car des souris délétées pour cette séquence peptidique infectées avec le virus Influenza A présentent un fort taux de mortalité et des modifications pathologiques plus sévères que les souris sauvages. Ces souris invalidées pour PrP^C montrent notamment une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires et une charge virale plus importante au niveau des poumons. Cette observation a pu être faite car lorsque PrP^C est réintroduite dans ces souris délétées, la mortalité est drastiquement diminuée et le profil inflammatoire est similaire aux souris sauvages infectées par le virus.

V. Modèles animaux pour l'étude de PrP^C

Dès les années 1960, des expérimentations animales ont été menées sur des hamsters, souris et chèvres, entre autres, dans le but d'étudier la transmission et la propagation du prion infection. L'isoforme pathogène de PrP^C étaient inoculées aux animaux et les scientifiques étudiaient la période d'incubation, l'apparition des symptômes et réalisaient des expériences post-mortem sur les échantillons prélevés. Ces expérimentations ont notamment permis de découvrir la nature

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

protéique de l'agent infection. Cependant, ces travaux ne permettaient pas d'explorer les paramètres génétiques, biochimiques et cellulaires de la protéine PrP^C.

Ainsi, dans les années 1990, des modèles murins génétiquement modifiés pour le gène *Prnp* ont été développés.

V.1. Génération de modèles murins génétiquement modifiés pour le gène *Prnp*

Les différents modèles murins invalidés pour le gène *Prnp* ont été générés selon deux stratégies (404) (Figure 24) :

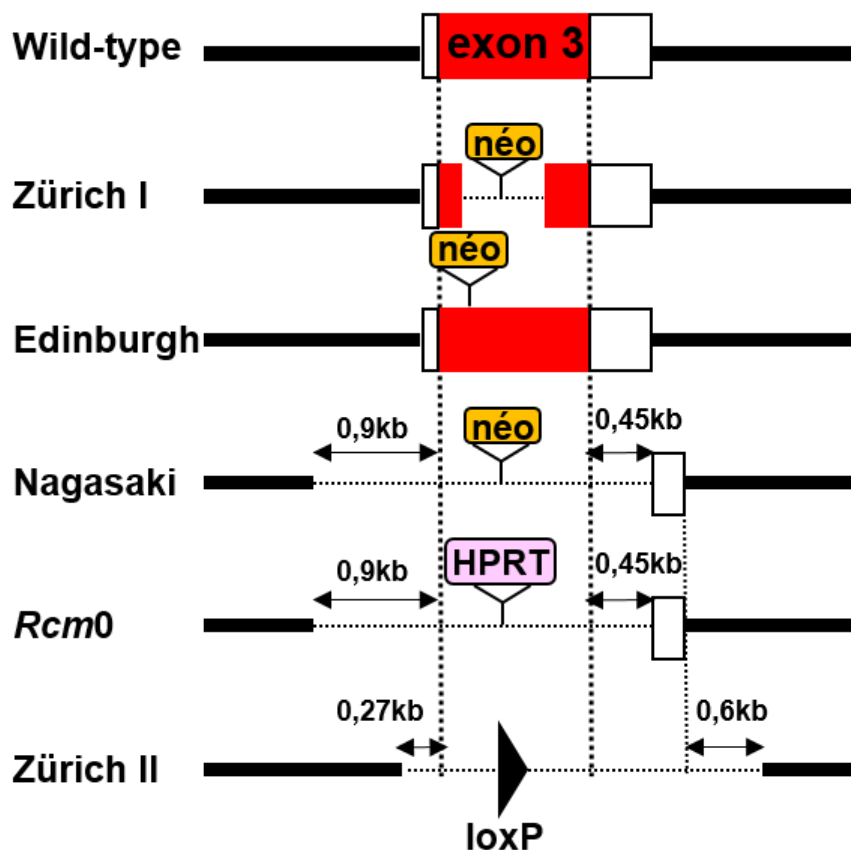


Figure 24 : Stratégies génétiques utilisées pour invalider le gène *Prnp* par recombinaison homologue dans des modèles murins. Rectangles rouges : cadres de lecture ORF, rectangles blancs : régions non codantes, étiquettes jaunes ou roses : séquences insérées, lignes pointillées : régions supprimées. Schéma adapté de "Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. Rossi D. et al. EMBO J. 20-4. p 694-702. 2001".

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

La stratégie "conservatrice" consiste à introduire des modifications génétiques limitées seulement au cadre de lecture ORF de l'exon 3 (souris nommées Zurich I et Edinburgh) (405).

La stratégie "radicale" dans laquelle la séquence ORF est entièrement supprimée et les sites d'épissage du troisième exon sont modifiés (souris nommées Nagasaki, *Rcm0* et Zurich II).

Dans les deux cas, l'insertion d'une cassette néomycine, HRPT (Hypoxanthine Phosphoribosyl-Transférase) ou loxP (locus of crossing-over from Phage) entraîne la suppression de l'expression du gène *Prnp*.

Les souris de type Zurich I et Edinburgh se développent normalement et ne présentent pas de pathologies particulières. Les souris de type Nagasaki, *Rcm0* et Zurich II se développent également normalement mais développent une ataxie grave et une perte de cellules de Purkinje en vieillissant (406),(407). De manière surprenante, les deux types de souris invalidés pour le gène *Prnp* sont résistants aux maladies à prion et à la propagation de la protéine PrP^{Sc} (405).

Lignée	Gène codant pour PrP ^C	Nombre de copie du gène	Quantité d'ARN de PrP ^C	Quantité de protéine PrP ^C
<i>Prnp</i> ^{+/+}	<i>Prnp</i>	2	1	1
<i>Prnp</i> ^{0/+}	<i>Prnp</i>	1	0,5	0,5
<i>tga19</i> ^{+/+}	<i>hgPrnp</i>	30	ND	3-4
<i>tga20</i> ^{+/+}	<i>hgPrnp</i>	30	1,2	6-7
<i>tga20/tga20</i>	<i>hgPrnp</i>	60	ND	10
<i>tgc35</i> ^{+/+}	<i>Prnp</i> (cosmid)	40	ND	4-5
<i>tgb24</i> ^{+/+}	<i>PrPcDNA</i>	150	<0,5	0
<i>tge19h</i> ^{+/+}	<i>PrPΔNco</i>	150	1,8	3-4
<i>tge19l</i> ^{+/+}	<i>PrPΔNco</i>	15	1	1,5-2,5
<i>tgdl1</i> ^{+/+}	<i>PrPΔN-term</i>	30	2,7	6
<i>tgdl2</i> ^{+/+}	<i>PrPΔN-term</i>	40	3,9	10-12

Figure 25 : Caractéristiques et expression de PrP^C dans les modèles murins de surexpression de *PRNP*. ND : Non Déterminé. Tableau adapté de " Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. Fischer M. et al. EMBO J. 15-6. p 1255-1264. 1996".

En parallèle des modèles d'extinction du gène *Prnp*, des modèles murins transgéniques de surexpression ont été développés via l'introduction de transgènes de *Prnp* (Figure 25) (408).

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

La surexpression du gène *Prnp* ne perturbe pas le développement des souris, cependant il a été observé que la lignée tga20 (transgene insertion a20) présente une période d'incubation du prion infectieux très courte comparée aux souris sauvages (408).

V.2. Impact de l'extinction et de la surexpression du gène *Prnp*

A la suite de la génération de ces modèles murins, de nombreux paramètres de PrP^C ont été mis en évidence. Néanmoins, la plupart des projets étaient focalisés sur l'étude de PrP^C uniquement au sein du système nerveux. Les résultats de ces travaux ont été résumés dans le tableau ci-dessous (Figure 26) :

	Effets	Références
Invalidation de <i>Prnp</i>	Altération du rythme circadien et du sommeil	(409)
	Diminution de la plasticité synaptique	(410)
	Altération du comportement, de la peur et de l'anxiété	(411) (412) (413)
	Dérégulation du métabolisme du fer	(337)
	Intolérance au glucose	(414)
	Activation de la prolifération des cellules précurseurs d'oligodendrocytes lors du développement et chez l'adulte	(415)
	Diminution de la concentration cuprique cérébrale	(338)
	Augmentation du nombre de mitochondries avec des anomalies morphologiques	(416)
	Augmentation de la phagocytose des macrophages	(417)
	Résistance aux infections à <i>Brucella abortus</i>	(393)
Surexpression de <i>Prnp</i>	Dysfonctions immunologiques	(418)
	Augmentation de la survie des neurones après une axotomie	(419)
	Amélioration de la plasticité synaptique	(420)
	Augmentation de la dégénération du système nerveux liée à l'âge	(421)
	Activation de la prolifération des cellules souches dérivées de la zone sous-ventriculaire	(422)
	Sensibilité aux infections du virus herpès simplex de type I	(423)

Figure 26 : Effets de l'extinction ou de la surexpression de la protéine PrP^C dans des modèles murins.

Introduction : Chapitre III – La protéine Prion cellulaire

L'implication de PrP^C dans les infections bactériennes respiratoires en lien avec l'inflammation bronchique reste méconnue en raison d'un nombre limité d'études menées sur cette thématique. Néanmoins, une étude de 2014 s'est intéressée au rôle de PrP^C après stimulation au LPS (383). Ainsi, les travaux de ce groupe ont pu mettre en lumière différentes observations :

Durant la phase d'infection aigüe du LPS, le niveau d'ARNm des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6 et IL-1 β) et des facteurs de transcription (ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases), p38 (p38 mitogen-activated protein kinase) et I κ B) est plus élevé dans le cerveau et la rate des souris sauvages que chez les souris PrP^{-/-}.

Au cours de la phase tardive de l'infection, les souris PrP^{-/-} conserve des niveaux plus élevés de cytokines pro-inflammatoires et un faible niveau de cytokines anti-inflammatoires (IL-10), tandis que chez les souris sauvages les taux sont inversés, la concentration en cytokines pro-inflammatoires diminue, alors que le taux de cytokines anti-inflammatoires augmente.

Les souris PrP^{-/-} présentent une résorption plus lente des leucocytes périphériques après leur recrutement lors de la réponse inflammatoire et une mortalité plus élevée en réponse au choc septique induit par le LPS par rapport aux souris sauvages.

L'ensemble des données présentées dans ces trois chapitres mettent en évidence la complexité de la physiopathologie de la mucoviscidose et le rôle protecteur primordial de la barrière épithéliale bronchique au sein des poumons. Dans ce contexte, nous avons orienté mon projet de thèse vers la recherche de nouveaux partenaires cellulaires de la protéine CFTR afin d'investiguer quant à l'origine du relâchement des jonctions cellulaires, de la facilité des pathogènes à envahir le parenchyme bronchique et de l'hyper-inflammation chronique pulmonaire.

Du fait de ses diverses implications cellulaires, notamment au sein des jonctions cellulaires et dans l'inflammation nerveuse, la protéine PrP^C s'est avérée être un excellent candidat pour notre étude. De plus, les rôles exacts de cette protéine au niveau pulmonaire sont encore inconnus et pour la première fois nous montrons l'implication de la protéine PrP^C dans la mucoviscidose.

Objectifs

Objectifs

Pourquoi une personne saine est-elle protégée contre les infections par des pathogènes opportunistes, tandis que les personnes atteintes de mucoviscidose ou qui présentent un épithélium pulmonaire endommagé sont particulièrement sensibles à ces infections ? Pour répondre à cette question, il est essentiel de bien comprendre l'interaction dynamique entre le microenvironnement hôte et ces pathogènes. Plusieurs paramètres tissulaires et des facteurs physico-chimiques peuvent individuellement ou collectivement favoriser l'infection aigue et chronique par ces pathogènes. Parmi ces facteurs il y a la barrière épithéliale. Cette dernière est le résultat d'un assemblage de cellules présentant une polarité structurale et fonctionnelle assurée par des interactions entre protéines transmembranaires et cytosoliques. Ces assemblages protéiques forment ainsi les différentes catégories de jonctions intercellulaires; serrées, adhérentes, desmosomes et communicantes.

La perte d'étanchéité au niveau de la barrière épithéliale pulmonaire est considérée comme un facteur clé qui participe à l'exacerbation du processus d'inflammation et d'infection en facilitant la transmigration tissulaire des cellules immunitaires et des pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

Dans ces processus, la protéine CFTR jouerait un rôle très important, mais qui est encore mal cerné et surtout très débattu.

La protéine CFTR a longtemps été considérée comme l'élément déterminant de la physiopathologie de la mucoviscidose. Ainsi, son activité canal chlorure et ses fonctions régulatrices, ont concentré la plus grande partie des thérapeutiques développées et des résultats très encourageants ont été obtenus, surtout pour la mutation G551D (~ 4 % des diagnostics). Néanmoins, ces résultats thérapeutiques contrastent avec le bilan inflammatoire et infectieux qui reste encore inférieur aux espérances attendues par les cliniciens.

Ces observations suggèrent surtout que d'autres facteurs comme ; les gènes modificateurs (gènes modulant la sévérité des différentes atteintes pathologiques des patients) ou les protéines dérégulées issues des dommages collatéraux de CFTR mutée, peuvent participer à la perte de l'étanchéité épithéliale constatée dans la mucoviscidose.

Récemment, nous avons montré au niveau des cellules bronchiques humaines saines que la protéine prion cellulaire (PrP^C) se lie aux protéines des jonctions adhérentes et desmosomes. A travers cette liaison, PrP^C protège ces protéines

Objectifs

contre le stress oxydatif et participe ainsi à la stabilité de ces jonctions. D'autres études ont également montré, que PrP^C serait impliqué dans la défaillance de la barrière épithéliale intestinale observée dans la maladie inflammatoire de Bowel. Il était donc logique d'entreprendre l'étude des rôles de PrP^C dans la mucoviscidose, maladie aussi caractérisée par l'inflammation et la perte de l'étanchéité de l'épithélium pulmonaire.

Ainsi, pour mon projet de thèse, deux objectifs ont été fixés :

1. Etude *in vitro* du rôle de la protéine PrP^C dans la barrière épithéliale bronchique en lien avec la mucoviscidose.

Pour cette partie, nous avons utilisé des modèles de lignées cellulaires bronchiques humaines pour étudier l'expression, la localisation, l'interaction avec les protéines des jonctions et avec la protéine CFTR sauvage (wt) et mutée (deltaF508), la résistance trans-épithéliale (RTE) et la perméabilité cellulaire ainsi que l'évaluation de la fraction membranaire et de la stabilité de PrP^C. Nous avons aussi étudié l'impact de la surexpression de PrP^C sur l'expression de CFTR et des jonctions intercellulaires et analyser la distribution cellulaire de PrP^C et des protéines jonctionnelles associées au trafic et à l'adressage des protéines CFTR sauvage et mutée.

2. Etude *in vivo* du rôle de la protéine PrP^C dans l'infection aigue en lien avec la protéine CFTR dans les modèles murins invalidés pour le gène *Prnp* ou le gène *Cftr*.

Sur le plan animal, nos travaux ont porté sur l'implication de PrP^C dans le passage paracellulaire de PA vers le parenchyme pulmonaire et dans la réponse inflammatoire.

Nous avons ainsi :

- ☞ Mesurer le passage paracellulaire de PA dans nos modèles cellulaires.
- ☞ Évaluer l'impact de PrP^C sur la dissémination bactérienne et le recrutement des cellules inflammatoires périphériques dans nos modèles murins.
- ☞ Comparer les structures pulmonaires de nos modèles murins par immunohistochimie avant et après infection par PA.
- ☞ Analyser le profil d'expression des jonctions intercellulaires avant et après l'infection aigue.

Objectifs

☞ La protéine PrP^C est importante dans l'homéostasie du cuivre, ainsi nous avons évalué la concentration du cuivre au niveau pulmonaire et hépatique (contrôle) dans nos modèles murins avant et après infections aigues par PA.

L'ensemble des résultats seront présentés sous forme de deux publications, préparées pour soumission:

- Johanna Cormenier, Mariam El Khatib, Amal Kouadri, Laurence Macari, Isabelle Michaud-Soret, Boubou Camara, Christelle Coraux, Nadia Alfaidy and Mohamed Benharouga.

"Cellular prion protein (PrP^C) is up regulated in cystic fibrosis: Role of CFTR protein."

- Johanna Cormenier, Marianne Marchioni, Laurence Macari, Boubou Camara, Nicolas LeMaître, Frédéric Sergent, Pierre Richaud, Nadia Alfaidy and Mohamed Benharouga.

"The cellular prion protein (PrP^C) contribute to the acute Pseudomonas aeruginosa lung infection in cystic fibrosis mice."

Résultats

Résultats : Article 1 – Cellular prion protein (PrP^C) is up regulated in cystic fibrosis: Role of CFTR protein.

I. Article 1 – Cellular prion protein (PrP^C) is up regulated in cystic fibrosis : Role of CFTR protein.

Cellular prion protein (PrP^C) is up regulated in cystic fibrosis : Role of CFTR protein.

Johanna Cormenier¹, Mariam El Khatib¹, Amal Kouadri¹, Laurence Macari¹, Isabelle Michaud-Soret¹, Boubou Camara⁴, Christelle Coraux³, Nadia Alfaidy² and Mohamed Benharouga¹.

¹ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5249, CEA, IRIG, CBM, F-38000 Grenoble, France.

² Univ. Grenoble Alpes, INSERM U1036, CEA, IRIG, BCI, F-38000 Grenoble, France.

³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR-S 903, Reims, France.

⁴ Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose, Clinique Universitaire de Pneumologie - Pole Thorax et Vaisseaux, CHU de Grenoble, France.

Cet article sera soumis à la revue "**Journal of Cell Science**".

Résultats : Article 1 – Cellular prion protein (PrP^C) is up regulated in cystic fibrosis: Role of CFTR protein.

I.1.Contexte de l'étude

Dans la mucoviscidose, l'absence d'expression de CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), une protéine canal chlorure activée par l'AMPc au niveau de la membrane apicale des cellules de l'épithélium bronchique, conduit au déséquilibre hydro-anionique, à l'augmentation de la viscosité du mucus et à la perturbation de la clairance mucociliaire. Ces changements vont induire une inflammation chronique des voies aériennes qui va progressivement impacter la fonction respiratoire. L'origine de l'inflammation reste cependant méconnue, en particulier l'inflammation précoce détectée en absence de toute infection microbienne. Cette inflammation est exacerbée par la transmigration des cellules de l'immunité et des pathogènes. La transmigration est un processus qui va dépendre principalement de la barrière épithéliale pulmonaire (BEP). Cette dernière est établie grâce aux jonctions intercellulaires, elles-mêmes formées de protéines de jonctions. Plusieurs études ont démontré l'implication de la protéine CFTR dans la diminution de l'étanchéité de la BEP. Toutefois, la localisation apicale de CFTR, différente de la localisation latérale des jonctions cellulaires suggère l'existence d'autres mécanismes régulant la BEP. Une des hypothèses est que CFTR par son jeu de trafic intracellulaire à travers des cycles de transcytoses, peut influencer l'adressage des protéines jonctionnelles. Tout récemment, nous avons démontré que la protéine prion cellulaire (PrP^C) participe au maintien des jonctions adhérentes et desmosomes au niveau des cellules épithéliales bronchiques humaines. Nous avons aussi démontré que cette protéine subit une transcytose assurant son trafic de la membrane apicale vers la membrane latérale où elle interagit, stabilise et protège les jonctions adhérentes et desmosomes du stress oxydatif. Au niveau des tissus épithéliaux, la PrP^C a été incriminée dans l'effondrement de la barrière épithéliale intestinale, caractéristique de la maladie inflammatoire de Bowel. Dans cette pathologie, la PrP^C semble perturber l'adressage des protéines jonctionnelles. Cependant, le rôle de cette protéine dans la mucoviscidose, une pathologie inflammatoire également caractérisée par une diminution de la barrière épithéliale bronchique n'est pas encore connu.

Résultats : Article 1 – Cellular prion protein (PrP^C) is up regulated in cystic fibrosis: Role of CFTR protein.

I.2.Résultats

Nous avons mis en évidence pour la première fois une dérégulation de l'expression de PrP^C dans la mucoviscidose, au niveau ARNm et protéine. Nous avons démontré une augmentation de l'expression de PrP^C dans des échantillons de bronches humaines CF et *in vitro* dans les cellules CFBE (dF508/dF508). Nous avons observé que la localisation de la protéine PrP^C à la membrane est plus diffuse dans les cellules CFBE comparé aux cellules épithéliales bronchiques saines (HBE), suggérant un défaut d'adressage de PrP^C. Nous avons constaté que la surexpression de la protéine CFTR sauvage (wt-CFTR) dans les cellules CFBE réduit la localisation diffuse de PrP^C à la membrane. Néanmoins, l'expression de wt-CFTR ne diminue pas le niveau d'expression de PrP^C. Par ailleurs, et de manière intéressante, nous avons observé une augmentation de l'expression de la forme hyperglycosylée (forme H) de PrP^C. La régulation de PrP^C serait liée à l'expression et à la localisation cellulaire de CFTR, en lien avec d'autres mécanismes cellulaires.

Nous avons mis en évidence que les protéines PrP^C et CFTR n'interagissent pas directement ensemble mais sont colocalisées à la membrane basolatérale. Aussi, cette colocalisation disparaît quand le processus de polarisation s'initie, excepté dans les cellules CFBE où l'on observe le défaut d'adressage de PrP^C.

Dans les cellules CFBE, nous rapportons une diminution dans les niveaux d'expression de protéines jonctionnelles clés telles que l'occludine, JAM-A, la plakoglobine et la desmoplakine. Toutefois, l'expression de wt-CFTR n'a pas permis de restaurer le niveau d'expression basal des protéines jonctionnelles. Enfin, nous avons également démontré que la surexpression de la protéine PrP^C dans les cellules HBE perturbe l'expression des jonctions cellulaires, suggérant que le niveau d'expression de PrP^C est un paramètre important soumis à une régulation très fine. De façon intéressante nous avons démontré que la surexpression de PrP^C entraîne une diminution de l'expression protéique de CFTR sans affecter son niveau d'ARNm, renforçant notre hypothèse de l'existence d'une relation d'expression protéique entre PrP^C et CFTR.

Résultats : Article 1 – Cellular prion protein (PrP^C) is up regulated in cystic fibrosis: Role of CFTR protein.

I.3.Conclusions

En conclusion, l'ensemble de nos résultats démontrent l'existence d'une relation entre les protéines CFTR et PrP^C dans la régulation de l'expression et de la localisation des protéines jonctionnelles. De plus, nos résultats concordent avec ceux rapportés concernant le rôle de PrP^C dans la protection et la stabilisation des protéines jonctionnelles au niveau intestinal.

D'un point de vue clinique, nos résultats démontrent que la protéine CFTR mutée affecte directement l'adressage de PrP^C vers le pôle latéral des cellules épithéliales bronchiques, où elle interagit et stabilise les protéines jonctionnelles. Ce défaut d'adressage de la PrP^C au pôle latéral expliquerait certaines caractéristiques de la mucoviscidose, telle que le défaut de la perméabilité épithéliale. Toutefois, notre étude a été principalement menée *in vitro* et des études supplémentaires *in vivo* sont essentielles pour confirmer ces hypothèses.

Néanmoins, la compréhension du rôle de la PrP^C dans la perméabilité épithéliale et le maintien des jonctions cellulaires représente un enjeu majeur dans la mucoviscidose, puisqu'à terme il pourrait contribuer au développement de thérapies anti-inflammatoires et réduire l'atteinte pulmonaire.

Cellular prion protein (PrP^C) is up regulated in cystic fibrosis: Role of CFTR protein.

Johanna Cormenier¹, Mariam El Khatib¹, Amal Kouadri¹, Laurence Macari¹, Isabelle Michaud-Soret¹, Boubou Camara⁴, Christelle Coraux³, Nadia Alfaidy² and Mohamed Benharouga¹.

¹ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5249, CEA, IRIG, CBM, F-38000 Grenoble, France.

² Univ. Grenoble Alpes, INSERM U1036, CEA, IRIG, BCI, F-38000 Grenoble, France.

³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR-S 903, Reims, France.

⁴ Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose, Clinique Universitaire de Pneumologie - Pole Thorax et Vaisseaux, CHU de Grenoble, France.

Running Title: CFTR controls PrP^C trafficking

Keywords: CFTR, PrP^C, cystic fibrosis, junctional proteins, epithelial barrier

Address correspondence to:

Dr. Mohamed Benharouga

LCBM-UMR5249

DRF-BIG, CEA-Grenoble

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

Téléphone: (33)-4-38-78-44-51

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

E-mail: mohamed.benharouga@cea.fr

Abstract

In cystic fibrosis (CF), the loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-associated cAMP-activated chloride channel has been proposed to affect the bronchial paracellular permeability. The latter is highly dependent on the intercellular junctional complexes, which consists of the tight (T), adherens (A), and desmosomes (D) junctions (J). However, the molecular mechanisms involved in the increase in the bronchial epithelial permeability (EP) in CF are unknown. Recently we demonstrated that the cellular prion protein (PrP^C) is important for the stability of A and D junctional proteins in normal bronchial epithelial cells. Yet, in CF disease, the role of PrP^C remains elusive. Herein, we investigate the expression, localization, interaction, biochemical profiles and the roles in EP of wild-type (wt)-, mutant (dF508)-CFTR, junctional, and PrP^C proteins in human healthy and CF conditions. Using normal (16HBE14o-), CF (CFBE41o-) and CF overexpressing wt-CFTR (CFBE41o-wt) cells, we first demonstrated that the PrP^C mRNA and protein levels were highly expressed in CF compared to the control cells. Similar results were found in CF versus healthy bronchial tissue samples. The PrP^C increase was not corrected in CFBE41o-wt cells. In CF cells, PrP^C protein showed a diffuse expression and increased residency time (RT) at the plasma membrane along with a mislocalization profile. The latter, but not the RT was corrected by wt-CFTR overexpression in CF cells. The upregulation and the mislocalization of PrP^C protein did not affect its ability to interact with junctional proteins. However, the overexpression of wt-CFTR or PrP^C protein could not correct the levels of expression of junctional proteins in the CF condition. No interactions were detected between PrP^C and wt- or dF508-CFTR proteins, however, wt-CFTR and PrP^C proteins showed a co-localized profiles that disappeared with the polarization process, except in CF cells. Interestingly, we found also that the levels of expression of wt-CFTR protein decreased in 16HBE14o- cells overexpressing PrP^C protein. Altogether, our results suggest that in bronchial epithelial cells CFTR trafficking is required for the normal distribution and localization of PrP^C protein, a key actor of the stability of adherens and desmosome proteins and that the retention of dF508-CFTR at the ER affects the normal PrP^C transcytosis from the apical to the lateral membrane. These findings bring new insights into the understanding of the CF-dysregulated EP.

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is an inheritable autosomal-recessive disease characterized by a multi-organ pathology affecting airways, as well as the intestinal and the reproductive tracts ([Cutting, 2015](#)). More than 2000 mutations have been identified in the CF transmembrane conductance regulator (CFTR) gene that codes for the CFTR protein; an epithelial apical transmembrane, cAMP-activated Cl⁻ channel and a regulatory protein ([Cutting, 2015](#)). About 70% of CF mutations correspond to the deletion of a phenylalanine at position 508 (delF508) ([Kerem et al., 1989](#)). This mutation is responsible for the retention and rapid degradation of CFTR in the endoplasmic reticulum (ER) ([Benharouga, 2001](#)).

The absence of a functional CFTR leads to unbalanced hydro-anionic efflux, reduced airway volume and pH, and defective mucociliary clearance resulting in mucus dehydration, bronchial inflammation and infection, which is the main cause of morbidity and mortality in CF patients ([Cutting, 2015](#)). In CF, the major host factors that protect the lung against infection are altered. Although an extensive work has been devoted to the study of the CF gene and the multiple functions of CFTR, the origin of pulmonary superinfection is still poorly understood.

Respiratory tissues are extensively colonized at the late stages of the disease by bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza* and *Pseudomonas aeruginosa* (PA) ([Quinton, 1990](#)).

Bacterial infection in the CF lung environment is multifactorial and is mainly related to the loss of the apical function of the CFTR protein ([Yang et al., 2011](#)), ([Pier, 2012](#)). However, recent work incriminates other factors such as the presence of an imbalance in the transport of bicarbonates ([Pier, 2012](#)), ([Quinton, 2007](#)) and the loss of the cellular junctional barrier ([Ruan et al., 2014](#)), ([Fiorotto et al., 2016](#)). Indeed, the disruption of the intercellular junction of CF bronchial epithelium is associated with an increase in epithelial cell permeability and an invasion by infectious agents ([Bebok et al., 2005](#)), ([Vivekananda et al., 1994](#)). Expression of wild-type (wt) CFTR in delF508-CF cells (CFBE41o (-)) increased the trans-epithelial resistance (RTE) and decreased the paracellular permeability of mannitol ([LeSimple et al., 2010](#)). Altogether, these studies suggested that the trafficking and the chloride channel activity of the CFTR protein might contribute to the assembly and function of the airway epithelial barrier. However, CFTR protein is localized at the apical side compared to junctional proteins that are restricted to the lateral membrane of polarized cells, suggesting that other mechanisms could be involved in the control of the pulmonary epithelial barrier and in the cross talk between the two cellular sites. Three main types of

intercellular junctional complexes are responsible for the sealing of the bronchial epithelium: tight (T), adherens (A) and desmosomes (D) junctions (J) ([Vasileva and Citi, 2018](#)). Recently, we demonstrated that the cellular prion protein (PrP^C) is expressed in the lateral side of fully polarized bronchial epithelial cells (16HBE14o-) where it interacts and protects adherens and desmosomes junction proteins against oxidative stress ([Kouadri et al., 2018](#)).

PrP^C is a glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)-anchored glycoprotein known for its unique ability to undergo structural conversion from a normal isoform (PrP^C) into a pathogenic conformer known as scrapie (PrP^{Sc}) ([Prusiner, 1991](#)). The physiological role of the cellular PrP^C has mainly been associated with stress-protection ([Prusiner, 1991](#)), ([Rachidi et al., 2003](#)), copper homeostasis ([Alfaidy, 2013](#)) and neuronal excitability ([Khosravani et al., 2008](#)). Other functions related to cellular processes and metabolism have also been reported for this protein ([Castle and Gill, 2017](#)).

In the peripheral epithelial tissues, the pathophysiological role of PrP^C has been investigated *in vitro* and *in vivo* only in intestinal barrier in relation to the inflammatory Bowel Disease ([Petit et al., 2012](#)). However, its role in the context of CF disease in relation to the bronchial integrity is still unknown.

Given the role of PrP^C protein in the control of cell-cell interaction and in the protection of the junctional proteins against oxidative stress, we hypothesized that PrP^C may also play a role in the stability of the bronchial barrier in CF, an inflammatory disease characterized by a loss of the junctional barrier.

Material and Methods

Human tissues collection:

Peripheral human lung tissues (containing non cartilaginous airways) were obtained from Grenoble Hospital (Pulmonary department) at the time of lung transplantation from 10 nonsmoking CF adults, and from 10 nonsmoking controls undergoing lung resection upon peripheral lung cancer (Grenoble Hospital). Clinical characteristics of these patients are reported on Table 1. Collection and processing of human lungs were conformed to the declaration of Helsinki and, to all the rules of the local Committees on Human Research. Informed consent was obtained from each patient.

Lentiviral overexpression:

A lentiviral system was used to overexpress the *prnp* gene in 16HBE14o- cells (HBE-PrP). The *prnp* sequence containing SPR signal and hemagglutinin (HA) tag was cloned in the lentiviral vector pLVX-IRES-mcherry-C1 (Clontech, France), between EcoRI and BamHI restriction sites. The resulting vector was then transfected into the HEK293T cells for packaging and generation of lentiviral particles. Then, HBE cells were infected with the lentiviral particles for 24h. The positive cells were selected using flow cytometry based on the fluorescent protein mcherry and the overexpression was confirmed using real-time RT-qPCR, immunoblotting and immunofluorescence assays.

Immunohistochemistry:

Ready 5- μ m paraffin-embedded sections prepared from a human CF and non CF peripheral lung tissues were used. Slides were generously obtained from Pr. Lantuejoul, (Dept. of Pathology, DACP, Grenoble Hospital) and from Dr. Coraux (INSERM, UMR-S 903, Reims, France). Immunohistochemistry was performed as described previously ([De Keukeleire et al., 2007](#)). For antigen detection, sections were incubated with the anti-PrP antibody (SAF32, Bertin-Pharma, France). Immunopositive staining was detected using a Neostain ABC kit, HRP, mouse (NeoBiotech), with DAB (3, 3'-diaminobenzidine) as the chromogen (NeoBiotech). Slides were counterstained using hematoxylin (Sigma Aldrich). Control sections were treated either with the secondary antibody alone or with the anti-PrP^C antibody (SAF-32), preabsorbed overnight at 4°C with the appropriate antigen peptide (Covalab, Lyon, France).

Culture cells:

The following human bronchial epithelial cell lines were used: 16HBE14o- (HBE) ([Cozens et al., 1994](#)), CFBE41o- (CFBE, homozygote for dF508 mutation), and its corresponding

plasmid corrected CFBE41o-cell line, overexpressing wt-CFTR (CFBE-wt) ([Iilek et al., 2008](#)).

All these cells are kindly gifted by Dr Dieter C. Gruenert, California Pacific Medical Center Research Institute, San Francisco, CA, USA.

HBE-PrP, HBE, CFBE and CFBE-wt cells were grown in culture-adherent plates in Minimal Essential Medium (MEM) with L-glutamine (Sigma-Aldrich, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, France). For the CFBE-wt, 2µg/mL puromycine (Sigma-Aldrich) was added as selective agent. Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95 % air with culture medium change three times weekly. Where indicated, cells were treated with vehicle or different concentrations of copper (Cu) or cycloheximide 100µg/mL for the indicated times.

Immunofluorescence :

Expression and localization of PrP^C, CFTR and junctional proteins were visualized by the mouse monoclonal anti-PrP (SAF32, Bertin-Pharma), the rabbit polyclonal anti-PrP (ab703, Abcam), the mouse monoclonal anti-CFTR (R&D system), the rabbit polyclonal anti-ZO-1 (Invitrogen), the mouse monoclonal anti-E-cadherin (Takara, France), the rabbit polyclonal anti-palakovglobin (Abcam, France) and the mouse monoclonal anti-HA (Sigma-Aldrich, France) antibodies. Rhodamine-and fluorescein-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit (life technologies) were used as secondary antibodies. The X/Z projection and the fluorescence micrographs were obtained with a Zeiss LSM880 Fast Airyscan laser confocal fluorescence microscope. Confocal images were scanned using the pinhole 1UA, and the multitrack scanning mode.

FITC-Dextran permeability:

Cells were seeded on 12mm polycarbonate membrane inserts with a pore of 0.4µm (Transwell®, Corning®, Costar®). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled dextran 4kDa (Sigma Aldrich) was dissolved in phenol red-free MEM at 1mg/mL. The solution was added on the apical side of the cells. 5µL of the media were collected from apical and basal side every 5 min during 45 min incubation at 37°C. The concentration of FITC-dextran in the collected medium was measured using a fluorescent plate reader Infinite M200 (TECAN) at 495 nm excitation and 520 nm emission wavelength.

Proximity Ligation Assay (PLA):

Cells were seeded on glass coverslips for 8 days. The cells were washed in PBS buffer added with Ca²⁺ and Mg²⁺, fixed in 10% formalin, permeabilized with 0.2% Triton X-100, blocked in 0.5% BSA, and incubated for 1h with both anti-PrP (SAF32, Bertin-Pharma,

France) and anti-CFTR (R&D system, France) primary antibodies and then with the corresponding PLA secondary antibodies (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden).

Following incubation with anti-mouse (-) and anti-rabbit (+) secondary probes, the cells were incubated with free nucleotides for hybridization, DNA ligation and amplification as described previously ([Jarvius et al., 2007](#)). The cellular fluorescence was examined with a Zeiss Axiovert 200 M epifluorescence microscope under a 63x objective. Negligible amounts of PLA signal were detected in the absence of the primary or secondary antibodies.

Trans-Epithelial Resistance (TER):

Cells were seeded at confluence (day 0) on polycarbonate membrane inserts (Transwell®, Corning®, Costar®). TER was measured from day 1 to day 10 of cell culture using a Volt-Ohm Meter (Millipore, France).

Determination of cAMP-stimulated Iodide Conductance

The plasma membrane cAMP-dependent halide conductance of HBE, CFBE and CFBE-wt cells were determined with iodide efflux as described ([Sharma et al., 2001](#)). In brief, the chloride content was replaced with iodide by incubating the cells in loading buffer (136 mM NaI, 3 mM KNO₃, 2 mM Ca(NO₃)₂, 11 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4) for 60 min at room temperature. Iodide efflux was initiated by replacing the loading buffer with efflux medium (composed of 136 mM nitrate in place of iodide). The extracellular medium was replaced every minute with efflux buffer (1 ml). After a steady-state was reached, the intracellular cAMP level was raised by agonists (10 μM forskolin, 0.2 mM CTP-cAMP, and 0.2 mM isobutylmethylxanthine) to achieve maximal phosphorylation of wt-CFTR, and collection of the efflux medium resumed for an additional 6-9 min. The amount of iodide in each sample was determined with an iodide-selective electrode (Orion).

Cell surface biotinylation:

To determine the cell surface PrP^C protein expression, cells were biotinylated in the presence of 0.5mg/ml of sulphosuccinimidyl-2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionate (EZ-Link sulfo-NHS-SS-biotin; Pierce Chemical Co.) in HEPES buffer at 4°C during 30min. Cells were washed with ice-cold PBS, supplemented with 0.1% BSA, 1mM MgCl₂, and 0.1mM CaCl₂, and solubilized in RIPA buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, and 0.5% sodium deoxycholate, pH 8.0) supplemented with protease inhibitors (10 μg/ml leupeptin and pepstatin, 0.5 mM PMSF, and 10 mM iodoacetamide). Biotinylated PrP^C was isolated by immunoprecipitation on Streptavidin-Sepharose (Sigma Aldrich) and visualized by immunoblotting using anti-PrP antibody (SAF32, Bertin-Pharma).

mRNA extraction and RT-qPCR :

Total mRNA was extracted from bronchial tissues in the presence of 1mL of trizol, and from cells with NucleoSpin® kit (Macherey-Nagel). 1µg of the mRNA was reverse transcribed with iScript™ cDNA Synthesis kit (BioRad). The real time quantitative (q) RT-qPCR was performed using the studied genes primers (Table 2) and GoTaq® qPCR Master Mix provided by Promega. mRNA expression was quantified by RT-qPCR using CFX96™ Real-Time detection system (BioRad) and normalized to housekeeping genes 18S and GAPDH (Table 2).

Protein extraction:

Proteins were extracted at 4°C from bronchial tissue samples and cell lines as previously reported ([Kouadri et al., 2018](#)) in the presence of RIPA buffer supplemented with protease inhibitors.

For proteinase K (PK) treatment, cells were lysed in PBS containing 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, pH 7.4. Protein concentrations were measured using the Micro BCA protein assay kit (Thermo Scientific, France).

Endoglycosidase and proteinase K (PK) digestion

To distinguish between high mannose and complex-type N-linked oligosaccharide modification of PrP^C, cell lysates were incubated with endoglycosidase H (H) and peptide N-glycosidase F (F) as previously reported ([Micoud et al., 2015](#)). The mobility shift of deglycosylated PrP^C was visualized by immunoblotting using an anti-PrP mAb (SAF32). For PK treatment, cell lysates were incubated with 20µg/ml PK for 3h at 37°C, and the reaction was stopped by adding PMSF (3mM).

Immunoprecipitation and immunoblotting:

For immunoprecipitation assay, cells were lysed at 4°C for 20min in RIPA buffer added with protease inhibitors. Protein extracts were incubated 2h with 1 µg/ml of anti-PrP antibody (SAF32, Bertin-Pharma) at 4°C, and immunoprecipitated with protein G-coupled sepharose beads (Sigma Aldrich) for 2h hours at 4°C. Protein samples were eluted for 10min with Laemelli Sample Buffer (LBS) containing 10% of β-mercaptoethanol, subjected to SDS-PAGE, transferred into nitrocellulose membranes (Bio-Rad) and probed with corresponding primary; anti-ZO1 (Invitrogen) or anti-E-cadherin (Takara), or anti-plakoglobin (Abcam), or anti-desmoplakin (Abcam), or anti-desmoglein (Covalab), or anti-occludin (Sigma Aldrich) antibodies. The antigen-antibody reaction was revealed using IgG antibody coupled to HRP (Covalab) and developed with ECL (BioRad) using Fusion

FX7 (Vilbert Lourmat). Immunoblots, with multiple exposures, were quantified using DuoScan transparency scanner and N.I.H. Image 6.1 software (developed by the National Institutes of Health and available at their web site). β -actin protein and S-Ponceau staining were used as loading control.

Statistical analysis:

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

Results

PrP^C is highly expressed in CF

PrP^C protein which is expressed in a wide range of tissues and cell types ([Kouadri et al., 2018](#)), was shown to participate to the alteration of colonic epithelia cell-cell junctions and barrier function in patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD) ([Petit et al., 2012](#)), suggesting its involvement in the control of the barrier function of epithelial tissues. In CF disease also characterized by lung inflammation and junctional barrier disruption, the role of PrP^C remains elusive.

To shed light on the potential involvement of PrP^C in CF, we first assessed its level of expression and characterized its tissue distribution and localization in human bronchi of healthy and CF patients. Using RT-qPCR, we demonstrated that PrP^C is highly expressed in CF samples compared to normal specimens (Fig. 1A). The mRNA results were strengthened at the protein level using western blotting analysis and ImageJ quantification (Fig. 1B and 1C). The anti-PrP antibodies recognized three different PrP^C forms in protein extracts from healthy and CF bronchi samples (Fig. 1B). The forms correspond to the unglycosylated (U~24 kDa), the immature glycosylated (I~26-30 kDa) and the mature highly glycosylated PrP^C (H~31-37 kDa). To analyze the tissue distribution in human bronchi, we performed immunohistochemical analyses using human healthy and CF lung sections. PrP^C protein was strongly expressed in CF lung sections compared to the healthy samples (Fig. 1D (c,d)). PrP^C protein was mainly observed in the cytoplasm and at lateral and apical sides of cilia cells (Fig. 1D (c,d)). PrP^C was also detected in blood vessels with stronger expression in CF patients (Fig. 1D (c,d)). Incubation in the absence of the primary antibody (Fig. 1D (a)), or in the presence of the primary antibody (SAF32) that has been preincubated overnight with the immunogen peptide (Fig. 1D (b)) confirmed the specificity of PrP^C detection at the bronchial level. These results are in line with the recently reported data regarding the localization of PrP^C in healthy human bronchial tissues ([Kouadri et al., 2018](#)). These data substantiate the findings at the mRNA and protein levels and suggest that PrP^C protein might participate into the pathophysiological features of CF disease.

PrP^C is highly expressed in CF bronchial epithelial cells

Since the immunohistochemical analyses showed that PrP^C is mainly expressed in bronchial epithelial cells both in healthy and CF tissue sections, we used normal (16HBE14o-; HBE), cystic fibrosis (CFBE41o-; CFBE) and corrected CFBE41o-

(CFBE41o- overexpressing wild type (wt)-CFTR; CFBE-wt) bronchial epithelial cell lines to characterize the cellular expression and the localization profiles of PrP^C protein.

Using RT-qPCR, we demonstrated that PrP^C mRNA was highly expressed in CF tissues but also in CFBE compared to HBE cells (Fig. 2A). Similar results were obtained using immunoblot assay, where the three forms of PrP^C protein, H, I and U were detected both in HBE and CFBE (Fig. 2B). The quantification of independent experiments indicated that the all three PrP^C forms were significantly increased in CFBE compared to HBE cells (Fig. 2C). Finally, immunofluorescence of PrP^C in highly polarized HBE and CFBE cells showed a plasma membrane localization. PrP^C expression was stronger and much diffused in CFBE compared to HBE cells (Fig. 2D).

CFBE cells are originated from a CF patient carrying a homozygous dF508 mutation ([Kunzelmann et al., 1993](#)). Hence, the observed deregulation in the expression of PrP^C in CF may be due to the physical absence of wt-CFTR from the plasma membrane, to the absence of Cl⁻ secretion, or to the retention of dF508-CFTR in the endoplasmic reticulum (ER) compartment. To verify these hypotheses we used the CFBE-wt cell line that was generated from the parental CFBE by overexpressing wt-CFTR ([Bebok et al., 2005](#)).

First, we confirmed that the overexpression of wt-CFTR in CFBE cells increased the copies number of CFTR gene and the level of expression of the corresponding protein (Fig. S1-A-B-C). The overexpression of wt-CFTR restored the cAMP-Cl⁻ secretion in CFBE cells that was measured using iodide efflux assays (Fig. S1-D).

Importantly, the restoration of wt-CFTR protein at the plasma membrane and the correction of Cl⁻ secretion increased the H form of PrP^C (Fig. 2B-C). In addition, immunofluorescence data showed that this correction reduced the diffused PrP^C expression observed in the CFBE cells (Fig. 2D). Altogether these data suggest that CFTR protein may interfere with PrP^C trafficking and distribution in bronchial epithelial cells.

CFTR protein controls the stability of the PrP^C highly-glycosylated (H) form.

The ER retention of dF508-CFTR or the overexpression of wt-CFTR mainly increased the levels of expression of PrP^C H-form (Fig. 2B). This might occur through the stabilization of the H-form at the plasma membrane.

To verify this hypothesis, we first evaluated the level of the H-form expression in the plasma membrane fraction using the cell surface biotinylation assays. Figures 3A and 3B show that most of the H-form are associated with the plasma membrane of CFBE and CFBE-wt cells, yet this association was more significant in CFBE-wt compared to CFBE cells (Fig. 3A and 3B). Because, the stability of proteins is the major parameter that controls

their expression at the plasma membrane, we assessed the stability kinetic of PrP^C protein using the cycloheximide (CHX) assays (Fig. 3C). The quantification of three independent experiments reported in figure 3D shows that the half-life ($t_{1/2}$) of the H form is significantly increased in CFBE ($t_{1/2}$ ~ 1.5h) and in CFBE-wt ($t_{1/2}$ ~ 3h) compared to HBE cells ($t_{1/2}$ ~ 0.75h).

These result was not the consequence of a change in the overall stability of the wt- and dF508-CFTR, since both proteins exhibited a stability rate of ~12h and ~40 min (Fig. 3E), respectively, comparable to what has previously been reported ([Sharma et al., 2001](#)). The stability of I- and U-forms were also evaluated and the results demonstrate that their stability was also increased in CFBE and CFBE-wt cells compared to HBE (Fig. S2 and Table S1).

Importantly, the inhibition of CFTR associated Cl⁻ channel activity, using the specific inhibitor; CFTR_{inh}172 did not affect the levels of expression of PrP^C, both in HBE and in CFBE-wt cells (data not shown). This data suggest that the regulation of PrP^C expression is not associated with the CFTR chloride channel activity, but rather with its expression and cellular localization.

The biochemical structures of PrP^C protein are preserved in CF

Because the abnormal stability of PrP^C could also be due to a change in its tridimensional structure, as was previously reported for the prion diseases ([Peggion et al., 2017](#)), we evaluated three parameters that characterize PrP^C structural changes; its pattern of glycosylation, its resistance to proteinase K (PK) and its response to copper (Cu) stimulation ([Varela-Nallar et al., 2006](#)). As previously demonstrated ([Alfaidy, 2013](#)), we confirmed that the glycosylation of the H-form was sensitive to N-glycosidase F (F) and insensitive to endoglycosidase H (H), indicating the expression of the mature PrP^C form in all tested cell lines (Fig. 4A). The PK test, commonly used to detect the Scrapie form of PrP (PrP^{Sc}) showed that the PrP^C was completely digested upon PK treatment, confirming the absence of any switch of PrP^C form towards PrP^{Sc} form ([Peggion et al., 2017](#)) (Fig. 4B). Finally, we demonstrated that the expression of the PrP^C in the three cell lines was stimulated by Cu treatment (Fig. 4C and 4D). Cu treatment during 24h increased PrP^C expression at the protein (Fig. 4C) and mRNA (Fig. 4D) levels in a concentration dependent manner. In CFBE cells, the increase in PrP^C expression was significant starting 50 μ M of Cu concentration. In HBE and CFBE-wt cells, this effect appears only at 100 μ M of Cu, suggesting that PrP^C is more sensitive to Cu in CFBE cells (Fig. 4C). Similar results were

obtained in a time dependent manner under a Cu concentration of 100 μ M [Fig. S3-A and S3-B], with a significant starting 4 hours of treatment.

The protein data showed a specific and significant increase in the hyperglycosylated (H) form of PrP^C protein (Fig. 4C and S3-A). We further demonstrated that Cu increased the PrP^C membrane binding in all tested cell lines (HBE, CFBE and CFBE-wt), as the biotinylated form of PrP^C significantly increased after 14 hours of incubation in the presence of 100 μ M of Cu 100 μ M, (Data not shown). These results were also confirmed using confocal microscopy (Data not shown). The effect of Cu was not cell dependent since similar treatments increased, in a time and concentration dependent manners, the level of expression of PrP^C in the bronchial epithelial cells; IB3-1 and in S9; an IB3-1 cells corrected with wt-CFTR (Fig. S4).

Abnormal localization of PrP^C protein in CF

We have shown that both wt- and dF508-CFTR conditions increased the membrane stability of the PrP^C H-form (Fig. 3), suggesting the existence of a potential interaction between the two proteins. Hence, we investigated the cellular localization, the proximity expression and the biochemical interactions of PrP^C and CFTR proteins in HBE, CFBE, and CFBE-wt cells.

For the cellular localization, we used immunofluorescence cell imaging and X/Z image reconstitution to analyze the distribution of PrP^C and CFTR at 3 and 10 days of cell culture. These conditions were chosen because the polarization process is known to interfere with PrP^C and CFTR trafficking and localization ([Kouadri et al., 2018](#)). First, we demonstrated that both proteins colocalize in CFBE compared to HBE and CFBE-wt cells (Fig. 5A and B). The colocalization disappears with the polarization process except in CFBE cells (Fig. 5A and B).

Recently, we reported that in HBE cells PrP^C protein exhibits an apical/lateral localization, at three days of culture to an exclusively lateral localization at 10 days of cell culture ([Alfaidy, 2013](#)), ([Morel et al., 2008](#)) (Fig. 5A and B). In CFBE cells, the PrP^C trafficking was disturbed (Fig. 5B). Interestingly, PrP^C trafficking was corrected by the overexpression of wt-CFTR, suggesting a potential involvement of the of CFTR protein in the targeting and redistribution of PrP^C in bronchial epithelial cells.

In HBE cells, most of the CFTR fluorescence was cytoplasmic with a weak apical staining at 3 days that increased at 10 days of cell culture (Fig. 5A and B). Compared to CFBE, CFTR was found at apical membrane and in the cytoplasm of the CFTR overexpressing cells (Fig. 5A and B). The mistargeting of PrP^C protein in CFBE cells was substantiated

using immuno-cell surface detection in non- and permeabilized conditions. As reported in figure 5C, in non-permeabilized CFBE cells PrP^C protein exhibited an apical and basolateral localizations compared to HBE monolayers. The correction with wt-CFTR modified the PrP^C localization profile in CFBE-wt (Fig. 5C). While PrP^C was apical, lateral and basolateral in the CF context, it became apical when CFTR is overexpressed (Fig. 5C). The CFTR-PrP^C colocalization was further confirmed using proximity ligation assay (PLA), a technique that allows *in situ* visualization and quantification of membrane proteins that are within 10Å of each other ([Micoud et al., 2015](#)). CFTR and PrP^C proteins were detected using rabbit anti-PrP and mouse anti-CFTR primary antibodies. We observed an increase in PLA signal in CFBE and CFBE-wt compared to HBE cells (Fig. 5D). The fluorescently labeled bundle represent the formation of one molecular interaction that corresponds to CFTR-PrP^C complex in individual cells. Analysis using Blobfinder 3.1 software (Uppsala University) revealed that from 50 cells per experiment, a ~3 fold increase in PLA signal/cell was detected in CFBE compared to HBE cells (Fig. 5E). The signals in CFBE-wt (~1.5 fold) was significantly increased compared to HBE cells, but were less abundant compared those detected in CFBE cells (Fig. 5E).

The colocalization and PLA results suggested that wt- and dF508-CFTR proteins might interact with PrP^C. To verify this hypothesis, we immunoprecipitated either CFTR or PrP^C proteins using anti-CFTR or anti-PrP^C antibody, respectively. The targeted proteins were detected using western-blot analysis. We demonstrated that CFTR and PrP^C proteins do not interact under biochemical conditions (Fig. S5-A and S5-B).

Trans-epithelial resistance (TER) and permeability are defective in CF

The up-regulation of PrP^C and its targeting defect suggested that this protein might be involved in the pathophysiology of CF. Recently, our group reported the importance of PrP^C in the stability of the junctional barrier in CF bronchial epithelial cells ([Kouadri et al., 2018](#)). Hence, we investigated the role of PrP^C in this process.

Airway epithelia are classified as moderately leaky structures because most trans-epithelial diffusion of ions occurs via the paracellular pathway ([Willumsen and Boucher, 1989](#)), ([Tamada et al., 2001](#)). An increase in the trans-epithelial resistance (TER) is likely to reflect a decrease in the shunt conductance and junction complexes permeability.

The necessary time for the establishment of TER in all tested cells was determined as a function of the number of days in culture. Under these conditions, the TER of CFBE monolayers was significantly lower than HBE monolayers (450 vs 380 Ω/cm^2 , $P < 0.005$),

(Fig. 6A). When wt-CFTR was expressed in CFBE cells that already contained endogenous dF508-CFTR we observed an increase in TER compared to HBE and CFBE ($\sim 750 \Omega/\text{cm}^2$, $P < 0.005$), (Fig. 6A).

To confirm that the overexpression of CFTR induced changes in TER were mediated by the paracellular pathway; we measured the permeability of the monolayers to FITC-dextran. The permeability of HBE monolayers to FITC-dextran was $400 \text{ F}/\text{cm}^2/\text{h}$, and increased to $950 \text{ F}/\text{cm}^2/\text{h}$ in the CFBE monolayer (Fig. 6B). However, a significant decrease was observed upon overexpression of wt-CFTR confirming the TER results (Fig. 6B). Thus, the decrease in TER and the enhanced permeability to dextran are strong indicators of the loss of bronchial epithelial barrier function in CF.

We and other groups have demonstrated that PrP^C interacts with proteins of the junctional complexes ([Kouadri et al., 2018](#)), ([Morel et al., 2008](#)).

To verify whether PrP^C protein retains its ability to interact with proteins involved in tight (ZO1, Occludin (Occ)), JAM-A), adherens (E-cadherin (E-cad)) and desmosomes (Plakoglobin (Plak), Desmoplakin (Desp), Desmoglein (Desg)) junctions, in the context of CF, we performed immunoprecipitation analyses. As indicated in figures 6C and 6D, PrP^C interacts with all tested proteins except ZO1, confirming the previously reported data ([Kouadri et al., 2018](#)). Moreover, the overexpression of wt-CFTR did not affect the immunoprecipitation results (Fig. 6C, D). However, the degree of polarization increased the amount of precipitated proteins as shown for occludin (Fig. 6D).

PrP^C colocalization with junctional proteins

Since PrP^C protein exhibited a mistargeting defect in CFBE cells that was associated with the degree of cell polarization, we conducted immunofluorescence cell imaging analysis (Fig. 7) and X/Z image reconstitution (Fig. 8) to investigate PrP^C colocalization profile with the junctional proteins at 3 and 10 days of cell culture. The merge results at 3 days demonstrate that ZO1, E-cad and Plak colocalized with PrP^C in HBE, CFBE and CFBE-wt cells. The colocalization profile was more diffuse in CFBE compared to HBE and CFBE-wt cells (Fig. 7A). However, at 10 days of culture, the merge signal disappears for ZO1, except for E-cad and Plak proteins for which a weak signal persists (Fig. 7B). We have also observed, mostly in CFBE cells, the appearance of a perinuclear structures that were not localized in the nucleus. The colocalization with a specific marker of the nucleus, Ki67, excluded this possibility (Fig. S7). These structures are probably the consequence of the

mistargeting of PrP^C protein observed in CFBE cells, as they disappeared when wt-CFTR was overexpressed in CFBE cells, (Fig. 7B).

The X/Z image reconstitution results also confirmed the presence of a targeting defect of PrP^C protein that became apparent at 10 days of polarization (Fig. 8A, B and C). In CFBE, PrP^C was mostly apical and basolateral as in HBE and CFBE-wt cells. However, once the polarization process is launched, PrP^C was founded in the lateral side of HBE but not in CFBE cells. Overexpression of wt-CFTR partially corrected the PrP^C targeting defect, suggesting that other factors might also be involved in this process (Fig. 8A, B and C).

These results indicate that the overexpression of wt-CFTR induced an increase in PrP^C expression that was correctly trafficked to the lateral membrane of polarized CF cells.

In contrast, in CFBE cells, even if the expression of PrP^C was significantly increased compared to HBE, the retention of dF508-CFTR in the ER caused an abnormal trafficking of PrP^C and increased its residency at the plasma membrane. The overexpression of PrP^C might modulate the paracellular permeability, likely at the level of the tight junctions.

PrP^C protein and the junctional complexes in the context of CF

The role of PrP^C protein in the junctional barrier is established by its ability to colocalize, interact, protect and stabilize the proteins of the junctional complexes ([Kouadri et al., 2018](#)). Therefore, we investigated these roles in the context of CF, by evaluating the level of expression of key proteins involved in tight, adherens and desmosomes junctions. The evaluation was performed at 3 and 10 days of confluence using western blot analysis and ImageJ quantification of three independent experiments. At day 3 of polarization, except for ZO1, E-cad and Desg, all other tested proteins showed a decrease in their levels of expression in CFBE compared to HBE cells (Fig. 9A and B). This decrease could not be corrected in CFBE-wt (Fig. 9A and B). Following 10 days of polarization, similar results has been obtained except for Plak, which expression levels became comparable to those found in HBE cells (Fig. 9C and D).

Overexpression of PrP^C protein in HBE cells affects the junctional proteins expression

To better understand the role of PrP^C in the expression profile of junction proteins in CF, we generated an HBE cell line overexpressing the hemagglutinin (HA)-tagged PrP^C protein using a lentivirus vehicle. Following stable infection in HBE cells (HBE-PrP), the expression of HA-tagged PrP^C protein was detected and evaluated using RT-qPCR, western blotting, and immunofluorescence analyses. Compared to parental HBE cells, PrP^C protein was increased by ~1.8 and ~2 fold at the mRNA and protein levels, respectively (Fig. 10A and B). Moreover, using anti-HA antibody, we confirmed the increase of PrP^C expression

at the cellular level. PrP^C was mostly detected at the plasma membrane (Fig. 10C). As previously reported by our group ([Alfaidy, 2013](#)), the overexpression did not affect the protein or the localization profile of PrP^C.

We also performed biochemical characterization of the HA-PrP^C and demonstrated that it exhibits similar glycosylation, PK digestion, and Cu stimulation profiles to the endogenous PrP^C protein. (Data not shown). Analysis of the junctional proteins (ZO1, Occ, JAM-A, E-cad, Plak, Desp and Desg) expression was performed using western blot. Except for Desg, we demonstrated that the overexpression of PrP^C downregulated JAM-A and Desp, and upregulates ZO1, Occ, E-cad and Plak (Fig. 10D). The results of JAM-A, Desp and Desg proteins are in the line with previous data in CFBE and CFBE-wt (Fig. 9), suggesting that PrP^C regulates the expression of these proteins. For ZO1, Occ, E-cad and Plak, we observed opposite patterns of expression to those observed in CFBE and CFBE-wt, suggesting that other mechanisms might be involved.

Wt-CFTR and PrP^C proteins participates in the regulation of the airway epithelial barrier using different mechanisms that are under investigation. Yet, the effect of PrP^C overexpression on CFTR expression is still unknown. Using HBE-PrP cells, we demonstrated that the overexpression of PrP^C decreased the level of CFTR protein without any effect on its mRNA (Fig. 10E, F and G), confirming that both proteins can mutually affect each other at the protein level. This was not an artifact of the use of virus strategy because infection with empty lentivirus had no effect on the junctional proteins or the CFTR expression (data not shown).

Such relationship is important for junctional proteins expression and therefore for the airway epithelial protection.

Discussion

The airway epithelial barrier (AEB) is a structure that contributes to the exacerbation of the disease-associated inflammatory and infection processes, through the increase of the paracellular permeability to bacteria and inflammatory cells ([Wittekindt, 2017](#)). Yet, AEB homeostasis is poorly investigated in the context of infectious and inflammatory diseases such as CF. This physical barrier relies on the cell polarization and interaction through junctional complexes ([Wittekindt, 2017](#)). Recently, we showed that PrP^C is a key protein of the junctional complex of human bronchial cells, particularly at the level of adherens junctions ([Kouadri et al., 2018](#)). However, the role of PrP^C protein in CF, a disease associated with a loss of epithelial barrier was still unknown.

This report is the first to demonstrate that in CF, PrP^C protein is upregulated at the mRNA and protein levels. This result is not specific to the PrP^C, since other cytosolic and membranous proteins have previously been reported to be deregulated in CF ([Farinha et al., 2018](#)). The amount of PrP^C protein expressed in CFBE was ~4 fold higher compared to HBE cells. Interestingly, similar levels of expression of PrP^C were observed in CFBE corrected with wt-CFTR, excluding the role of CFTR in in PrP^C biosynthesis. Importantly, CFBE cells are to be ranked among cells that express PrP^C at very high levels compared to the human neuronal cells (SH-SY5Y), mice N2a cells and epithelial cells such as MDCK and Caco-2 ([Kouadri et al., 2018](#)), ([De Keukeleire et al., 2007](#)), ([Morel et al., 2004](#)).

Our results demonstrate that the increased PrP^C expression is associated with CF and is independent of CFTR protein expression and activity, since CFTR_{inhi172} molecule, a specific inhibitor of CFTR associated Cl⁻ channel did not affect PrP^C levels (data not shown). Several studies have also shown that the upregulation of PrP^C is associated with several human pathologies such as the cerebral ischemia ([Weise et al., 2004](#)) and diseases-associated with hypoxia ([Liang et al., 2007](#)). The later, has been documented in CF ([Legendre et al., 2011](#)), suggesting potential upregulation of PrP^C by hypoxia in CF.

The immunofluorescence analysis also confirmed the increase of PrP^C expression and showed a diffuse sub-membranous localization that has been corrected in the presence of wt-CFTR. Since most PrP^C proteins are localized at the cell surface ([Westergard, 2007](#)), it was attempting to hypothesize that the diffuse localization of PrP^C in CFBE cells was due to its mistargeting and/or to the delay in its degradation from the plasma membrane. Both process have been confirmed through our results. Cell surface biotinylation and cycloheximide (CHX) studies demonstrated that PrP^C is stabilized at the cell surface in CFBE (t_{1/2}~90 min) compared to HBE (t_{1/2}~40 min) cells. Correction using wt-CFTR

protein doubled the PrP^C half-life ($t_{1/2}$ ~180 min) in CFBE-wt compared to the CFBE cells, demonstrating that the sub-membrane localization corresponds to the PrP^C H-form accumulation at the plasma membrane. To date, only PrP^C mutations and structural changes have been reported to induce a cytoplasmic accumulation and stabilization of the PrP^C H-form, in the context of neurodegenerative diseases ([Kupfer et al., 2009](#)). In CF, based on the deglycosylation profile, proteinase K digestion and Cu-stimulation results, no structural changes have been identified, confirming that the accumulation of PrP^C at the plasma membrane is the consequence of a delay in the endocytosis process that may occur in the absence of wt-CFTR. Similar role has been attributed to wt-CFTR in the control of the trafficking and targeting of different proteins in airway and kidney epithelial cells ([Saxena et al., 2005](#)), ([Saxena et al., 2006](#)), ([Devuyst and Luciani, 2015](#)).

However, even if both proteins colocalize and are present in a proximity domain, no physical interaction could be demonstrated in our conditions. The X/Z reconstitution results showed that the colocalization disappeared with the degree of polarization except in CFBE cells where PrP^C and CFTR proteins remained colocalized. While CFTR protein underwent a transcytosis from lateral to apical membranes, as recently reported ([Bidaud-Meynard et al., 2019](#)), in CFBE cells, where dF508-CFTR is trapped and degraded in the ER compartment ([Riordan, 1999](#)), the PrP^C protein has not been targeted to the lateral membrane as observed in HBE cells at 10 days of culture. This defect was corrected by the overexpression of wt-CFTR substantiating the role of CFTR in the PrP^C targeting in bronchial epithelial cells. Similar results have been reported for ENaC and CIC-5 channels ([Saxena et al., 2005](#)), ([Saxena et al., 2006](#)), ([Devuyst and Luciani, 2015](#)).

Other evidences have been provided using colocalization, interactions and TER measurements in relationship to the degree of cell polarization. Normal polarization and differentiation of airway epithelial cells is dependent on the integrity of intercellular junctions ([Farquhar and Palade, 1963](#)), ([Wang and Margolis, 2007](#)). Importantly, a link between CFTR and epithelial cell polarization has been reported, although the relationship is not well understood ([Hollande et al., 1998](#)).

In CF, the ability of PrP^C protein to colocalize and interact physically with the proteins of the adherens and desmosomes junctions such as E-cadherin, Plakoglobin and Desmoglein was preserved, even if the level of expression of the junction proteins was decreased in CFBE, excepted for ZO1, E-cadherin and Desmoglein. The wt-CFTR could not restore

their level of expression, demonstrating that CFTR protein participates in the control of the junctional barrier, but without interfering with proteins junctions' expression.

No interaction was observed between PrP^C and ZO1, even in the presence of a strong colocalization in CFBE, suggesting that both proteins moved to a domain where they can colocalized without interaction. However, and as previously reported ([Ruan et al., 2014](#)), we confirmed that CFTR interacts with ZO1 (data not showed). Such interaction has been shown to occur through CFTR PDZ-binding domain ([Ruan et al., 2014](#)). Compared to HBE, we observed a dot-shaped structure in CFBE cells that were not localized in the nucleus. These structures disappeared following wt-CFTR expression, suggesting that PrP^C and CFTR protein are colocalized in the same vesicle that traffic from the lateral toward the apical, for CFTR and from apical to the lateral side for PrP^C protein. When dF508-CFTR protein is blocked in the ER, the trafficking of the PrP^C from apical membrane is perturbed and the protein is trapped and not any more exhibiting a normal endocytosis. Such transcytosis process has been proposed for PrP^C in MDCK and HBE cells ([Puig et al., 2011](#)) and recently for CFTR protein ([Bidaud-Meynard et al., 2019](#)).

Even if the level of the key junctional proteins such as Occludin, JAM-A, and Desmoplakin in CFBE was not modified upon the overexpression of wt-CFTR in CFBE-wt cells, the TER was increased to an even higher level than to the one measured in HBE cells, confirming the role of CFTR in the control of the junctional barrier. This was previously shown to be associated with the tight junctions ([LeSimple et al., 2010](#)) and for the first time we showed that PrP^C protein is also involved in this process. Recently, we showed that knockdown of PrP^C protein decreased the TER in HBE cells, confirming the involvement of this protein in the control of the junctional barrier ([Kouadri et al., 2018](#)). Similar conclusions were drawn from studies conducted on the intestine ([Petit et al., 2012](#)).

Our results also demonstrate the existence of a relationship between CFTR and PrP^C proteins in the regulation of junctional proteins. Interestingly, the overexpression of PrP^C decreased the expression of the CFTR and disrupted the expression profile of the junctional proteins, even for ZO1. The increase of the level of ZO1 upon a decrease in CFTR expression was previously documented ([Ruan et al., 2014](#)), suggesting that CFTR stabilized ZO1 expression. Our results are in line with recent reported finding regarding the role of PrP^C in the protection and stabilization of the junctional proteins ([Kouadri et al., 2018](#)).

The clinical relevance of our finding reside on the demonstration that the mutated CFTR protein directly affects the PrP^C targeting to the lateral side of bronchial epithelial cells where it interact and stabilizes the adherens and desmosomes junction proteins. The

absence of PrP^C targeting to the lateral side might explain some of the hallmarks of the CF diseases such as abnormal cell permeability ([Cologio et al., 2002](#)), ([Hirsh, 2002](#)). It is to be noted that our study was mainly conducted *in vitro* and that further *in vivo* studies are mandatory to confirm these assumption. Nevertheless, it is well known that pro-inflammatory cytokines ([Coyne et al., 2002](#)) and bacterial toxins, for example *Pseudomonas aeruginosa* ([Vikström et al., 2006](#)), that might affect PrP^C expression and membrane localization, increase the airway epithelial leakage ([Elizur et al., 2008](#)).

Acknowledgments

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

We acknowledge the following sources of funding: CNRS (LCBM-UMR 5249), INSERM (U1036), UJF, and CEA/DSV/BIG), ABCF2 and VLM (Vaincre la Mucoviscidose, France). JC is fellowship from VLM (Vaincre la mucoviscidose, France); AK, is a fellowship from AGIR program (University of Grenoble).

Author Disclosure Statement

There is no conflict of interest.

References

- Alfady, N. C., S. Donadio-Andrei, S. Salomon, A. Saoudi, Y. Richaud, P. Aude-Garcia, C. Hoffmann, P. Andrieux, A. Moulis, J. M. Feige, J. J. and Benharouga, M.** (2013). Prion Protein Expression and Functional Importance in Developmental Angiogenesis: Role in Oxidative Stress and Copper Homeostasis. *Antioxidants & Redox Signaling* **18**, 400-411.
- Bebok, Z., Collawn, J. F., Wakefield, J., Parker, W., Li, Y., Varga, K., Sorscher, E. J. and Clancy, J.** (2005). Failure of cAMP agonists to activate rescued $\Delta F508$ CFTR in CFBE41o–airway epithelial monolayers. *The Journal of Physiology* **569**, 601-615.
- Benharouga, M. H., M. Kartner, N. and Lukacs, G. L.** (2001). COOH-terminal Truncations Promote Proteasome-dependent Degradation of Mature Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator from Post-Golgi Compartments. *The journal of cell biology* **153**, 957-970.
- Bidaud-Meynard, A., Bossard, F., Schnúr, A., Fukuda, R., Veit, G., Xu, H. and Lukacs, G. L.** (2019). Transcytosis maintains CFTR apical polarity in the face of constitutive and mutation-induced basolateral missorting. *Journal of Cell Science* **132**, jcs226886.
- Castle, A. R. and Gill, A. C.** (2017). Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Front Mol Biosci* **4**, 19.
- Colegio, O. R., Van Itallie, C. M., McCrea, H. J., Rahner, C. and Anderson, J. M.** (2002). Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **283**, C142-C147.
- Coyne, C. B., Vanhook, M. K., Gambling, T. M., Carson, J. L., Boucher, R. C. and Johnson, L. G.** (2002). Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol Biol Cell* **13**, 3218-34.
- Cozens, A. L., Yezzi, M. J., Kunzelmann, K., Ohrui, T., Chin, L., Eng, K., Finkbeiner, W. E., Widdicombe, J. H. and Gruenert, D. C.** (1994). CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **10**, 38-47.
- Cutting, G. R.** (2015). Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nature reviews. Genetics* **16**, 45-56.
- De Keukeleire, B., Donadio, S., Micoud, J., Lechardeur, D. and Benharouga, M.** (2007). Human cellular prion protein hPrPC is sorted to the apical membrane of epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 949-54.

Devuyst, O. and Luciani, A. (2015). Chloride transporters and receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubule. *The Journal of Physiology* **593**, 4151-4164.

Elizur, A., Cannon, C. L. and Ferkol, T. W. (2008). Airway inflammation in cystic fibrosis. *Chest* **133**, 489-495.

Farinha, C. M., Miller, E. and McCarty, N. (2018). Protein and lipid interactions – Modulating CFTR trafficking and rescue. *Journal of Cystic Fibrosis* **17**, S9-S13.

Farquhar, M. G. and Palade, G. E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *The journal of cell biology* **17**, 375-412.

Fiorotto, R., Villani, A., Kourtidis, A., Scirpo, R., Amenduni, M., Geibel, P. J., Cadamuro, M., Spirli, C., Anastasiadis, P. Z. and Strazzabosco, M. (2016). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator controls biliary epithelial inflammation and permeability by regulating Src tyrosine kinase activity. *Hepatology* **64**, 2118-2134.

Hirsh, A. J. (2002). Altering airway surface liquid volume: inhalation therapy with amiloride and hyperosmotic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 1445-1462.

Hollande, E., Fanjul, M., Chemin-Thomas, C., Devaux, C., Demolombe, S., Van Rietschoten, J., Guy-Crotte, O. and Figarella, C. (1998). Targeting of CFTR protein is linked to the polarization of human pancreatic duct cells in culture. *European journal of cell biology* **76**, 220-227.

Illek, B., Maurisse, R., Wahler, L., Kunzelmann, K., Fischer, H. and Gruenert, D. (2008). Cl transport in complemented CF bronchial epithelial cells correlates with CFTR mRNA expression levels. *Cellular Physiology and Biochemistry* **22**, 057-068.

Jarvius, M., Paulsson, J., Weibrecht, I., Leuchowius, K.-J., Andersson, A.-C., Wählby, C., Gullberg, M., Botling, J., Sjöblom, T. and Markova, B. (2007). In situ detection of phosphorylated platelet-derived growth factor receptor β using a generalized proximity ligation method. *Molecular & cellular proteomics* **6**, 1500-1509.

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

Khosravani, H., Zhang, Y., Tsutsui, S., Hameed, S., Altier, C., Hamid, J., Chen, L., Villemaire, M., Ali, Z. and Jirik, F. R. (2008). Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *The journal of cell biology* **181**, 551-565.

Kouadri, A., El Khatib, M., Cormenier, J., Chauvet, S., Zeinyeh, W., El Khoury, M., Macari, L., Richaud, P., Coraux, C., Michaud-Soret, I. et al. (2018). Involvement of the Prion Protein in the Protection of the Human Bronchial Epithelial Barrier Against Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*.

Kunzelmann, K., Schwiebert, E., Zeitlin, P., Kuo, W., Stanton, B. and Gruenert, D. (1993). An Immortalized Cystic Fibrosis Tracheal Epithelial Cell Line Homozygous for the LW508 CFTR Mutation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. Vol 8*, 522-529.

Kupfer, L., Hinrichs, W. and Groschup, M. H. (2009). Prion protein misfolding. *Current molecular medicine 9*, 826-835.

Legendre, C., Mooij, M. J., Adams, C. and O'Gara, F. (2011). Impaired expression of hypoxia-inducible factor-1 α in cystic fibrosis airway epithelial cells—A role for HIF-1 in the pathophysiology of CF? *Journal of Cystic Fibrosis 10*, 286-290.

LeSimple, P., Liao, J., Robert, R., Gruenert, D. C. and Hanrahan, J. W. (2010). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking modulates the barrier function of airway epithelial cell monolayers. *J Physiol 588*, 1195-209.

Liang, J., Bai, F., Luo, G., Wang, J., Liu, J., Ge, F., Pan, Y., Yao, L., Du, R. and Li, X. (2007). Hypoxia induced overexpression of PrPC in gastric cancer cell lines. *Cancer biology & therapy 6*, 769-774.

Micoud, J., Chauvet, S., Scheckenbach, K. E., Alfaidy, N., Chanson, M. and Benharouga, M. (2015). Involvement of the heterodimeric interface region of the nucleotide binding domain-2 (NBD2) in the CFTR quaternary structure and membrane stability. *Biochim Biophys Acta 1853*, 2420-31.

Morel, E., Fouquet, S., Chateau, D., Yvernault, L., Frobert, Y., Pincon-Raymond, M., Chambaz, J., Pillot, T. and Rousset, M. (2004). The cellular prion protein PrPc is expressed in human enterocytes in cell-cell junctional domains. *J Biol Chem 279*, 1499-505.

Morel, E., Fouquet, S., Strup-Perrot, C., Pichol Thievend, C., Petit, C., Loew, D., Faussat, A. M., Yvernault, L., Pincon-Raymond, M., Chambaz, J. et al. (2008). The cellular prion protein PrP(c) is involved in the proliferation of epithelial cells and in the distribution of junction-associated proteins. *PLoS One 3*, e3000.

Peggion, C., Bertoli, A. and Sorgato, M. C. (2017). Almost a century of prion protein(s): From pathology to physiology, and back to pathology. *Biochem Biophys Res Commun* **483**, 1148-1155.

Petit, C. S., Barreau, F., Besnier, L., Gandille, P., Riveau, B., Chateau, D., Roy, M., Berrebi, D., Svrcek, M., Cardot, P. et al. (2012). Requirement of cellular prion protein for intestinal barrier function and mislocalization in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **143**, 122-32 e15.

Pier, G. B. (2012). The challenges and promises of new therapies for cystic fibrosis. *Journal of Experimental Medicine* **209**, 1235-1239.

Prusiner, S. B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *SCIENCE* **252**, 1515-1522.

Puig, B., Altmepfen, H. C., Thurm, D., Geissen, M., Conrad, C., Brulke, T. and Glatzel, M. (2011). N-Glycans and Glycosylphosphatidylinositol-Anchors Act on Polarized Sorting of Mouse PrPC in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *PLoS One* **6**, e24624.

Quinton, P. M. (1990). Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport. *The FASEB Journal* **4**, 2709-2717.

Quinton, P. M. (2007). Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology* **22**, 212-225.

Rachidi, W., Vilette, D., Guiraud, P., Arlotto, M., Riondel, J., Laude, H., Lehmann, S. and Favier, A. (2003). Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery. *J Biol Chem* **278**, 9064-72.

Riordan, J. R. (1999). Cystic fibrosis as a disease of misprocessing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator glycoprotein. *American journal of human genetics* **64**, 1499-1504.

Ruan, Y. C., Wang, Y., Da Silva, N., Kim, B., Diao, R. Y., Hill, E., Brown, D., Chan, H. C. and Breton, S. (2014). CFTR interacts with ZO-1 to regulate tight junction assembly and epithelial differentiation through the ZONAB pathway. *J Cell Sci* **127**, 4396-408.

Saxena, S., Singh, M., Engisch, K., Fukuda, M. and Kaur, S. (2005). Rab proteins regulate epithelial sodium channel activity in colonic epithelial HT-29 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **337**, 1219-1223.

Saxena, S. K., Singh, M., Shibata, H., Kaur, S. and George, C. (2006). Rab4 GTP/GDP modulates amiloride-sensitive sodium channel (ENaC) function in colonic epithelia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **340**, 726-733.

Sharma, M., Benharouga, M., Hu, W. and Lukacs, G. L. (2001). Conformational and temperature-sensitive stability defects of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in post-endoplasmic reticulum compartments. *J Biol Chem* **276**, 8942-50.

Tamada, T., Hug, M. J., Frizzell, R. A. and Bridges, R. J. (2001). Microelectrode and impedance analysis of anion secretion in Calu-3 cells. *Jop* **2**, 219-228.

Varela-Nallar, L., Toledo, E. M., Larrondo, L. F., Cabral, A. L. B., Martins, V. R. and Inestrosa, N. C. (2006). Induction of cellular prion protein gene expression by copper in neurons. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **290**, C271-C281.

Vasileva, E. and Citi, S. (2018). The role of microtubules in the regulation of epithelial junctions. *Tissue Barriers* **6**, 1539596.

Vikström, E., Tafazoli, F. and Magnusson, K.-E. (2006). Pseudomonas aeruginosa quorum sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells. *FEBS letters* **580**, 6921-6928.

Vivekananda, J., Lin, A., Coalson, J. J. and King, R. J. (1994). Acute inflammatory injury in the lung precipitated by oxidant stress induces fibroblasts to synthesize and release transforming growth factor- α . *Journal of Biological Chemistry* **269**, 25057-25061.

Wang, Q. and Margolis, B. (2007). Apical junctional complexes and cell polarity. *Kidney International* **72**, 1448-1458.

Weise, J., Crome, O., Sandau, R., Schulz-Schaeffer, W., Bähr, M. and Zerr, I. (2004). Upregulation of cellular prion protein (PrP^c) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. *Neuroscience Letters* **372**, 146-150.

Westergard, L. C., H. M. and Harris, D. A. (2007). The cellular prion protein (PrP^c): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 629-644.

Willumsen, N. J. and Boucher, R. C. (1989). Shunt resistance and ion permeabilities in normal and cystic fibrosis airway epithelia. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **256**, C1054-C1063.

Wittekindt, O. H. (2017). Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **469**, 135-147.

Yang, H., Xu, L., Sui, Y., Liu, X., He, C., Fang, R., Liu, J., Hao, F. and Ma, T.-H. (2011). Stimulation of airway and intestinal mucosal secretion by natural coumarin CFTR activators. *Frontiers in Pharmacology* **2**, 52.

Figures Legends

Figure 1: PrP^C expression in human bronchial healthy and cystic fibrosis (CF) samples.

(A) RT-qPCR of PrP^C mRNA in human bronchial tissue. The expression levels of PrP^C mRNAs were quantified by RT-qPCR and normalized to 18S and GAPDH levels. A.U : arbitrary unit. (B) Immunoblot detection of PrP^C protein in extracts from human bronchial tissues. Protein extracts were separated on 12% SDS-PAGE, transferred into nitrocellulose membrane, probed with anti-PrP antibody (SAF32) and visualized by ECL. The Ponceau red staining was used for standardization. Black, gray, and white arrowheads indicate the high- (H; 31-37 kDa), intermediate- (I; 26-30 kDa), and unglycosylated (U; 24 kDa) forms, respectively. (C) Quantification of the expression level of PrP^C protein in healthy (Non CF) and CF human bronchial tissues using NIH-Image J software (www.imagej.nih.gov). Data are expressed as mean \pm SE (n=4). Values overwritten with stars are significantly different from the control (Non CF) ($P < 0.05$). (D) Immunolocalization of PrP^C using mAb anti-PrP (SAF32) in healthy (c) and CF (d) human bronchial tissue. (a) and (b) are Negative controls, using the secondary antibody alone (a) or the SAF32 mAb preincubated (ImP) for 24h with the corresponding antigenic peptide (b). Bl : Bronchial lumen, BEC : Bronchial Epithelial Cells, Bv : Bronchial vessel. Scale bar=50 μ m.

Figure 2: PrP^C expression in normal (HBE), CF (CFBE) and wt-CFTR CFBE-corrected (CFBE-wt) human bronchial epithelial cells.

(A) Comparison of the PrP^C mRNA levels in human bronchial epithelial cells. The levels of expression of PrP^C mRNAs were quantified by real-time RT-qPCR and normalized to the 18S and the GAPDH levels. A.U : arbitrary unit. (B) Immunoblot detection of PrP^C in protein extracts prepared from the indicated cell lines. The black, gray and white arrows indicate highly (H), intermediate (I), and unglycosylated (U) forms of PrP^C protein, respectively. (C) ImageJ quantification of the expression of the three forms of PrP^C protein standardized to β -actin expression in the indicated cell lines. A.U: arbitrary unit. Values are the mean \pm SEM. * $P < 0.05$. (D) Immunofluorescence detection of PrP^C in HBE, CFBE and CFBE-wt cells. Cells were fixed, permeabilized, and immunostained for PrP^C with mAb anti-PrP (SAF32) and a fluorescein-conjugated secondary antibody.

Figure 3: PrP^C membrane expression and stability in HBE, CFBE and CFBE-wt cells.

(A) Detection of PrP^C protein in HBE, CFBE and CFBE-wt cells extracts before and after cell surface biotinylation. PrP^C was covalently labelled with NHS-SS-biotin at 4°C.

Biotinylated PrP^C was affinity isolated on streptavidin beads and immunoblotted with anti-PrP mAb (SAF32). Neither intermediate (I, white arrowheads) nor unglycosylated (U, gray arrowheads) forms were susceptible to biotinylation. (B) ImageJ quantification of the total and biotinylated PrP^C Hyperglycosylated (H)-form. A.U: arbitrary unit. (C) Degradation rate of PrP^C protein in HBE, CFBE and CFBE-wt using cycloheximide (CHX) assays. For the indicated times, cells were incubated in the presence of 100µg/mL of CHX. Protein extracts were separated on 12% SDS-PAGE, transferred into nitrocellulose membrane, probed with anti-PrP^C antibody (SAF32) and visualized by ECL. (D) ImageJ quantification of the remaining PrP^C H-form in the presence of CHX. The results are expressed as a percentage of the control (0h). The half-life of PrP^C protein was determined for each tested cell line. (E) Degradation profile of wt-and dF508-CFTR proteins evaluated in CFBE-wt and CFBE cells, respectively, using cycloheximide (CHX) assays. For the indicated times, cells were incubated in the presence of 100µg/mL of CHX. Protein extracts were separated on 12% SDS-PAGE, transferred into nitrocellulose membrane, probed with anti-CFTR antibody (24.1) and visualized by ECL. Black, gray and white arrowheads indicates complex-, core- and un-glycosylated forms of CFTR protein, respectively

Figure 4: Characterization of PrP^C biochemical profile in HBE, CFBE and CFBE-wt cells.

(A) Endoglycosidase H (H) and N-glycosidase F (F) digestion profiles of PrP^C protein. (B) Protein digestion with proteinase K (PK, 20 µg/ml) for 1 hour at 37°C. (C) Cells were treated with increasing concentrations of CuSO₄ (50-150 µM) for 24 hours. For (A), (B) and (C), cell lysates were separated on 12% SDS-PAGE, transferred into nitrocellulose membrane, probed with anti-PrP mAb (SAF32) and visualized by ECL. The black, gray and white arrows indicate highly (H), intermediate (I), and unglycosylated (U) forms of PrP^C protein, respectively. (D) Following copper treatment, PrP^C mRNAs expression levels were quantified by real-time RT-PCR, normalized to the 18S and the GAPDH levels and plotted as function of Cu concentration (µM). A.U: arbitrary unit. Data are expressed as mean ± SE (n=4). Values overwritten with stars are significantly different from the control (0µM of Cu). Values are the mean ± SEM. * P<0.05.

Figure 5: Localization profiles of PrP^C and CFTR proteins in HBE, CFBE and CFBE-wt cells.

(A) Co-immunofluorescence labeling of PrP^C, CFTR and nuclei (blue, Hoechst) was performed in non-polarized (3 days) and polarized (10 days) HBE, CFBE and CFBE-wt cells. (B) X/Z projections were reconstructed from horizontal optical section of labeled

cells at three and ten days of cell culture. ap: apical, bl: basolateral. (C) X/Z projections from horizontal optical section of non-permeabilized and permeabilized cells labeled with an anti-PrP antibody. (D) Proximity Ligation Assay of PrP^C and CFTR protein using the Duolink kit. The PLA probes generates an amplified signal only when the two proteins are in close proximity (< 40 nm). The proximity was indicated by the yellow dots. The cellular fluorescence was examined with a Zeiss laser confocal scanning microscopy under a 63× oil objective. (E) Quantification of the fluorescently labeled bundle using Blob finder 3.1 software (Uppsala University). Values are the mean ± SEM. * P<0.05.

Figure 6: Characterization of PrP^C roles in junctional barrier of HBE, CFBE and CFBE-wt cells.

(A) Cells were seeded at confluency (day 0) on polycarbonate filters and the trans-epithelial resistance (TER) was measured each day during twelve days. (B) The permeability of cell monolayer was evaluated using the FITC-dextran efflux. The fluorescence results were normalized to the filter area and to the time. (C) PrP^C was immunoprecipitated (IP) using mAb anti-PrP^C (SAF32) and protein G coupled to sepharose. The eluted proteins were subjected to immunoblots using anti-E-cad (E-cadherin), anti-ZO1, anti-Plak (Plakoglobin), or anti-Desg (Desmoglein). INP: input (10% of the protein extract before immunoprecipitation). (D) PrP^C was immunoprecipitated (IP) following three and ten days of cell culture using mAb anti-PrP (SAF32) and protein G coupled to sepharose. The eluted proteins were subjected to immunoblots using anti-Occ (Occludin).

Figure 7: Co-localization of PrP^C with junctional proteins.

(A) and (B) Immunofluorescence detection of PrP^C and ZO1, E-cad or Plak proteins at three (A) and ten (B) days of cell culture. Cells were fixed, permeabilized, and co-immunostained for PrP^C (fluorescein-conjugated secondary antibody) and ZO1, E-cad or Plak (rhodamine-conjugated secondary antibody). The cellular fluorescence was examined with a Zeiss laser confocal scanning microscopy under a 63× oil objective.

Figure 8: Plasma membrane targeting of PrP^C protein in HBE, CFBE and CFBE-wt cells.

Co-immunofluorescence labeling of PrP^C and ZO1 (A), E-cad (B) or Plak (C) using fluorescein or rhodamine-conjugated secondary antibody, respectively. X/Z projections were reconstructed from horizontal optical section of labeled cells at three and ten days of cell culture using laser confocal scanning microscopy (Carl Zeiss). ap: apical, bl: basolateral.

Figure 9: Expression of junctional proteins in HBE, CFBE and CFBE-wt cells.

(A) and (C) Immunoblot detection of ZO1, Occluding (Occ), JAM-A, E-cad, Plak, Desmoplakin (Desp) and Desg in protein extracts prepared from three or ten days cultured cells. Proteins were separated on 12% SDS-PAGE, transferred into nitrocellulose membrane, probed with the corresponding antibodies and visualized by ECL. The black arrows indicate the molecular weight for the corresponding proteins. (B) and (D) ImageJ quantification of the expression of the junctional proteins was standardized to β -actin expression in the indicated cell lines. A.U: arbitrary unit. Values are the mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

Figure 10: The consequences of PrP^C overexpression on CFTR and junctional proteins in HBE cells.

(A) Comparison of PrP^C mRNA in human bronchial epithelial cells that overexpress PrP^C protein (HBE-PrP^C). The levels of expression of PrP^C mRNAs were quantified by RT-qPCR and normalized to the 18S and the GAPDH levels. A.U: arbitrary unit. (B) Immunoblot detection of PrP^C in protein extracts from the HBE-PrP^C and the parental cells HBE. (C) Immunofluorescence detection of PrP^C in HBE and HBE-PrP^C cells. Cells were fixed, permeabilized and immunostained for PrP^C with mAb anti-PrP^C (SAF32) or anti-Hemagglutinine tag (HA) and a fluorescein-conjugated secondary antibody. (D) Immunoblot detection of ZO1, Occ, JAM-A, E-cad, Plak, Desp and Desg in protein extracts from the indicated cell lines. (E) Comparison of CFTR mRNA in human bronchial epithelial cells that overexpress PrP^C protein (HBE-PrP^C). The levels of expression of CFTR mRNAs were quantified by RT-qPCR and normalized to the 18S and the GAPDH levels. A.U: arbitrary unit. (F) Immunoblot detection of CFTR in protein extracts from the HBE PrP^C and the parental cells HBE. The grey arrow indicates the fully glycosylated mature CFTR form (band C) and the white arrow indicates the core-glycosylated CFTR (band B). (G) ImageJ quantification of the expression of the two forms of CFTR protein standardized to β -actin expression in the indicated cell lines. A.U: arbitrary unit. Values are the mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

Legends of supplementary figures

Figure S1: Characterization of CFTR expression in HBE, CFBE and CFBE-wt cells.

(A) Comparison of CFTR mRNA expression in indicated cell lines. The levels of expression of CFTR mRNAs were quantified by real-time RT-qPCR and normalized to the 18S and the GAPDH levels. A.U: arbitrary unit. (B) Immunoblot detection of CFTR in protein extracts prepared from HBE, CFBE and CFBE-wt cells. Protein extracts were

separated on 12% SDS-PAGE, transferred into nitrocellulose membrane, probed with anti-CFTR antibody (24.1) and visualized by ECL. Black, gray and white arrows indicate the complex-, core- and un-glycosylate CFTR, respectively. (C) ImageJ quantification of the expression of mature (C) and immature (B) forms of CFTR protein standardized to β -actin expression in the indicated cell lines. A.U: arbitrary unit. (D) Detection of cAMP-activated chloride channel using iodide efflux assays. The concentrations of iodide ions were measured with an iodide specific electrode following incubation with cAMP and forskoline cocktail. The stimulation Peak values were used to plot the results as nmoles/min.

Figure S2: PrP^C protein stability in HBE, CFBE and CFBE-wt cells.

(A) and (B) Following ImageJ quantification of the remaining PrP^C I- (A) and U-forms (B) that were evaluated in HBE, CFBE and CFBE-wt cells in the presence of cycloheximide (CHX), the results were presented in percentage compared to the control (0h) and the half-life ($T_{1/2}$) of PrP^C protein was determined in each condition.

Figure S3: Regulation of PrP^C mRNA and protein expression by copper in HBE, CFBE and CFBE-wt.

(A) Cells were treated with CuSO₄ (100 μ M) in a time dependent manner and the corresponding protein extracts were subjected to immunoblots using mAb anti-PrP (SAF32). (B) Following copper treatment, PrP^C mRNAs expression levels were quantified by RT-qPCR, normalized to the 18S and the GAPDH levels and plotted as function of time. A.U: arbitrary unit. Values are presented as mean \pm SEM.

Figure S4: Copper treatment upregulated PrP^C protein expression in IB3-1 and S9 cells.

(A) IB3 and S9 cells were treated with CuSO₄ in a time and concentration (μ M) dependent manners. Cell lysates were subjected to immunoblots using mAb anti-PrP (SAF32).

Figure S5: PrP^C and CFTR proteins immunoprecipitation.

(A) CFTR was immunoprecipitated (IP) using mAb anti-CFTR (24.1) and protein G coupled to sepharose. The eluted proteins were subjected to immunoblots using anti-PrP (SAF32) and anti-CFTR antibodies. Supernatant (Sp) was used as IP control. (B) PrP^C was immunoprecipitated (IP) using mAb anti-PrP (SAF32) and protein G coupled to sepharose. The eluted proteins were subjected to immunoblots using anti-PrP (SAF32) and anti-CFTR antibodies.

Figure S6: Co-localization of PrP^C and junctional proteins in HBE, CFBE and CFBE-wt cells.

(A) Immunofluorescence detection of PrP^C and Occ, JAM-A, Desp and Desg proteins in the indicated cell lines. At three days of confluence, the cells were fixed, permeabilized, and co-immunostained for PrP^C (fluorescein-conjugated secondary antibody) and Occ, JAM-A, Desp or Desg (rhodamine-conjugated secondary antibody). (B) X/Z projections were reconstructed from horizontal optical section of labeled cells at three days of confluence using laser confocal scanning microscopy (Carl Zeiss). ap: apical, bl: basolateral.

Figure S7: Co-immunofluorescence labeling of PrP^C and Ki67 in CFBE cells.

Co-immunofluorescence labeling of PrP^C, Ki67 protein and nuclei (blue, Hoechst) was performed in CFBE cells as described in figure S6.

Figure S8: mRNA expression of junctional proteins in HBE, CFBE and CFBE-wt cells.

(A) Quantification of ZO1, Occ, JAM-A, E-cad, Plak, Desp and Desg mRNA in human bronchial epithelial cells at three (A) and ten (B) days of confluence, using RT-qPCR. The levels of expression of ZO1, Occ, JAM-A, E-cad, Plak, Desp and Desg mRNAs were quantified by real-time RT-qPCR and normalized to the 18S and the GAPDH levels. A.U: arbitrary unit.

Table S1: Half-life of the three forms of the PrP^C protein.

The half-life of PrP^C forms were calculated from the three graphs reported in figures 3D, S2A and S2B. H: hyper-, I: intermediate-, U: un-glycosylated forms.

Figure 1

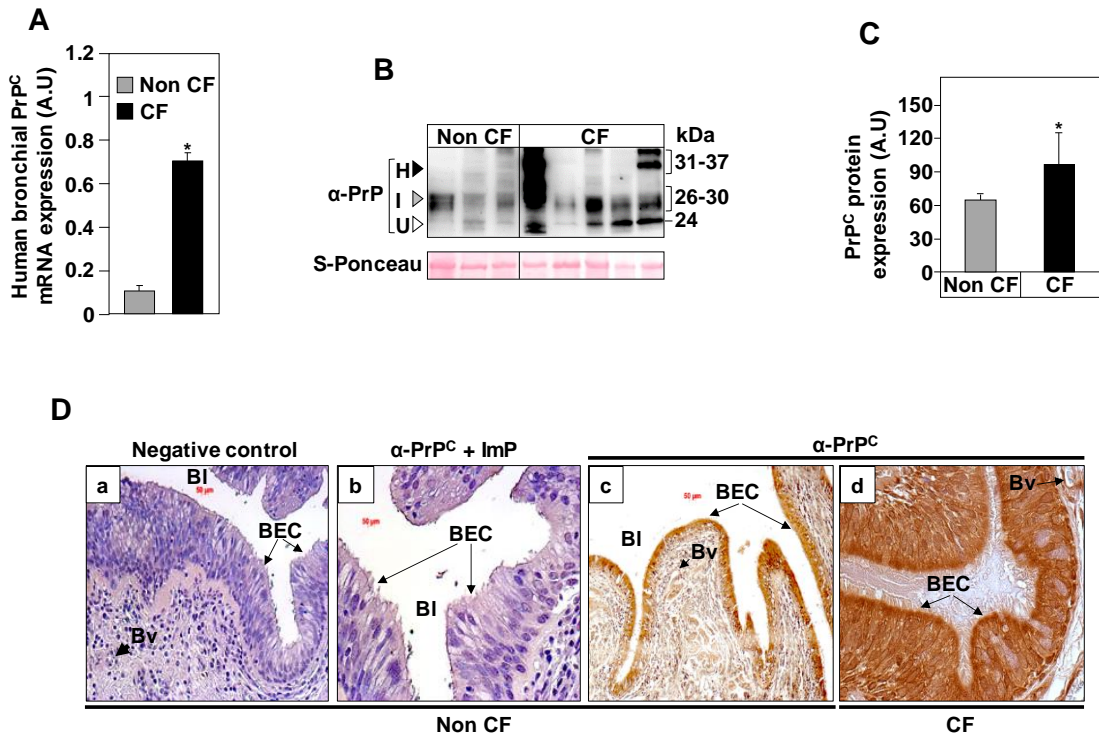


Figure 2

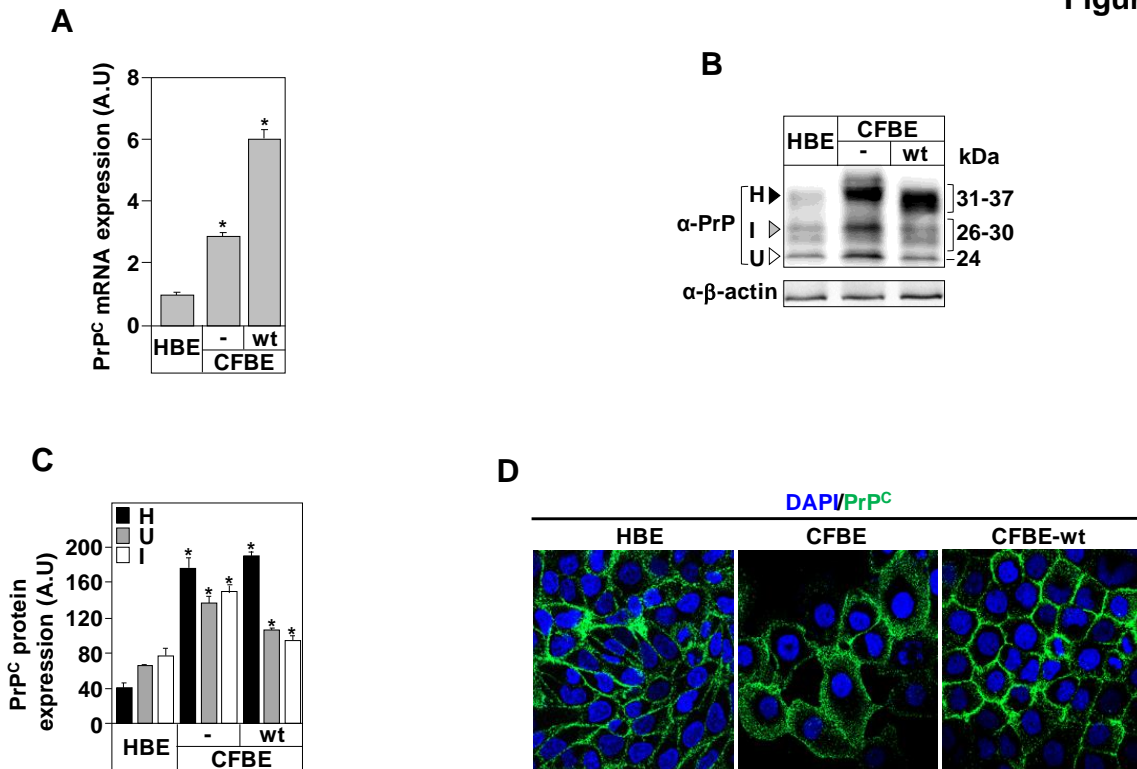


Figure 3

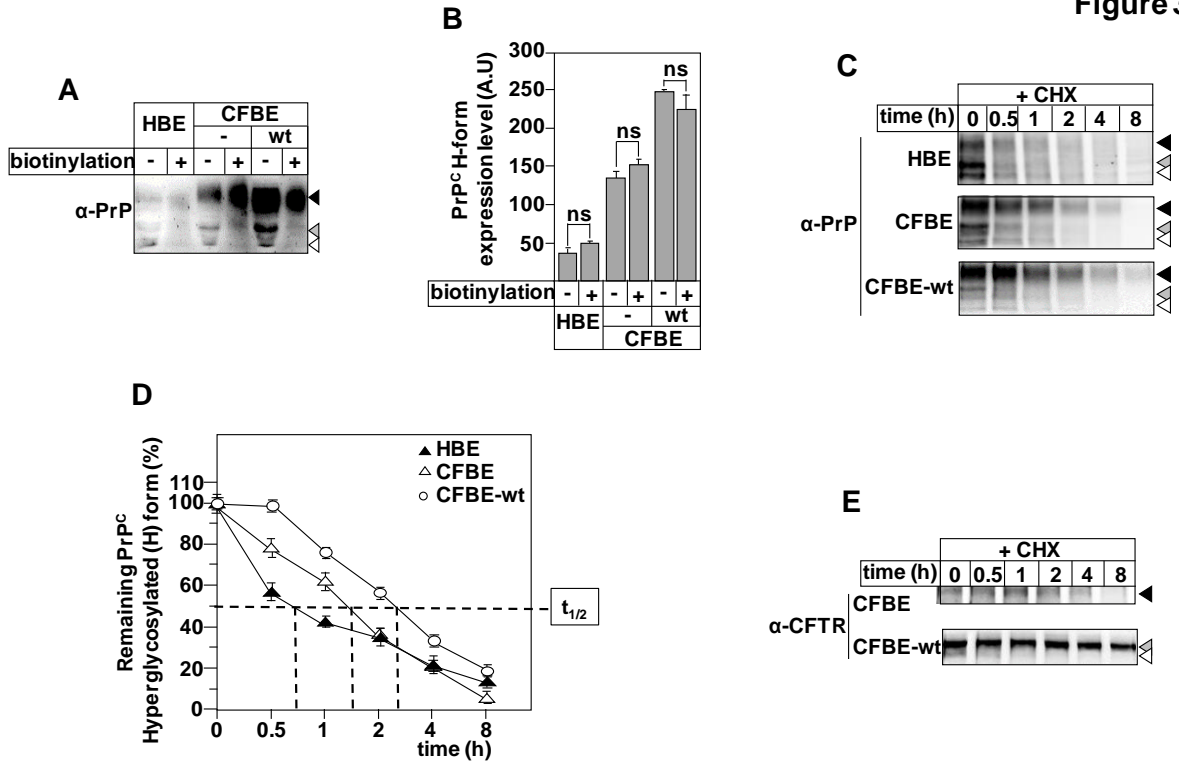


Figure 4

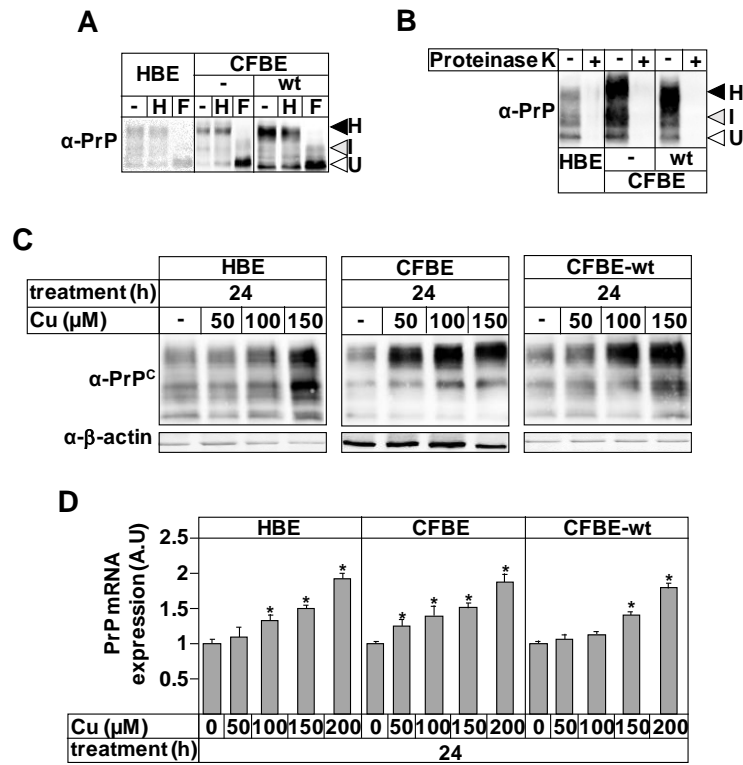


Figure 5

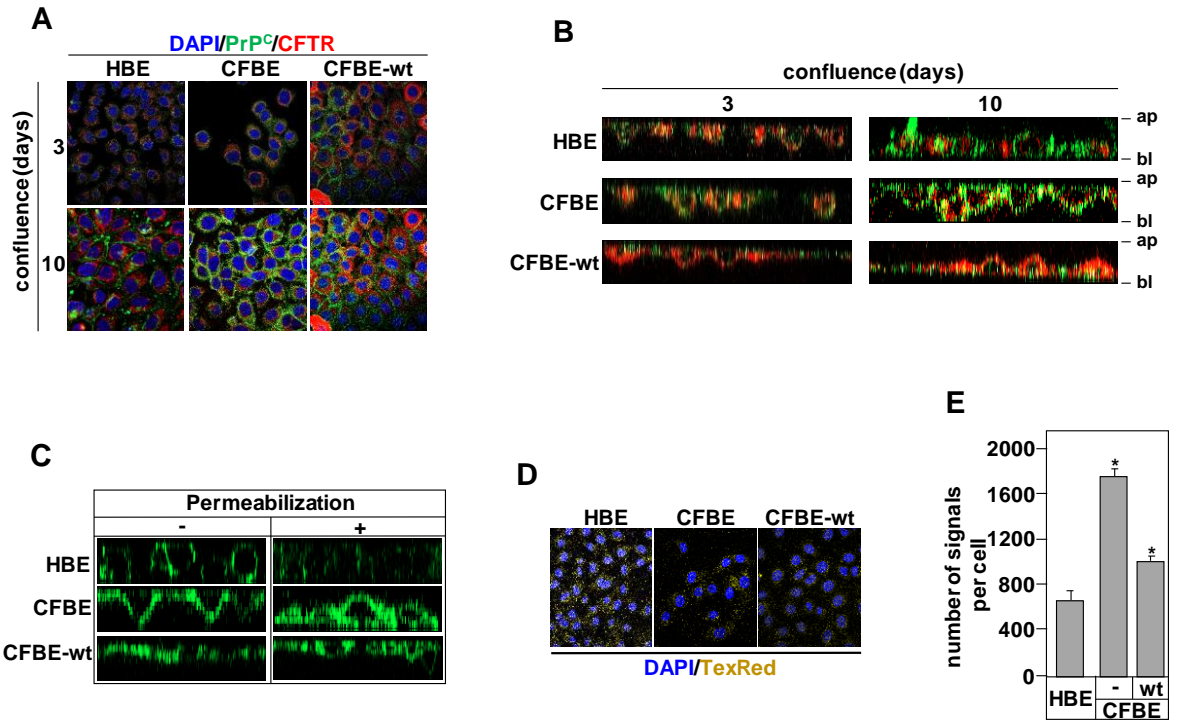


Figure 6

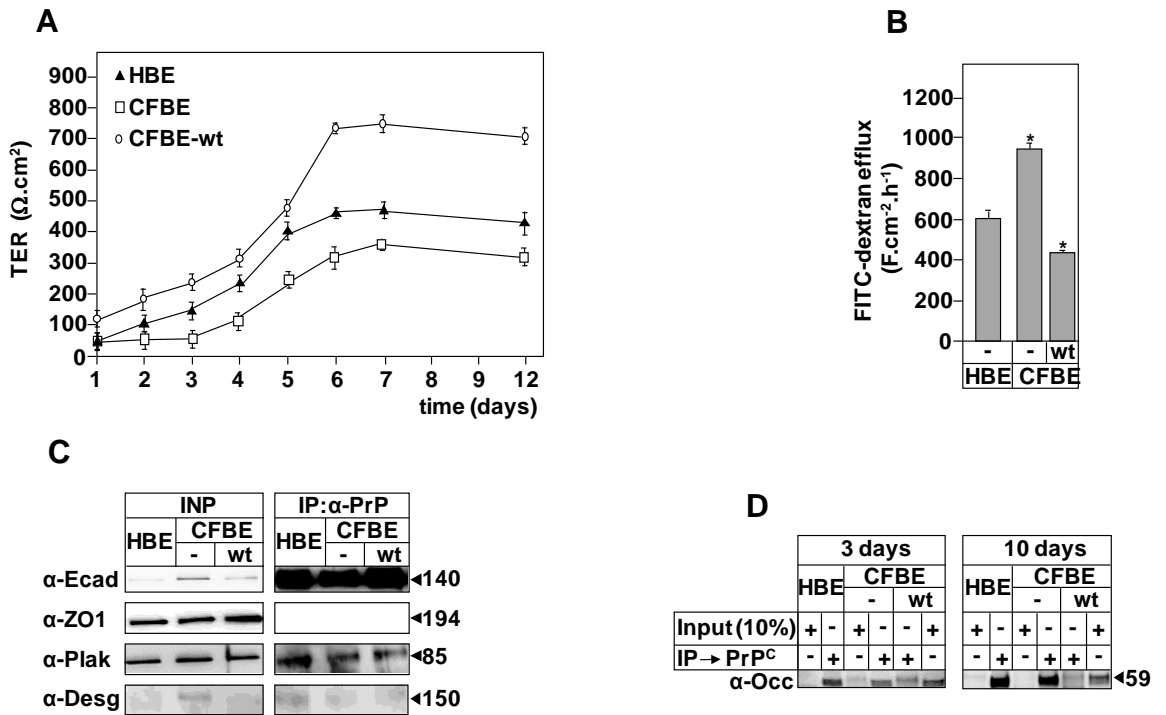


Figure 7

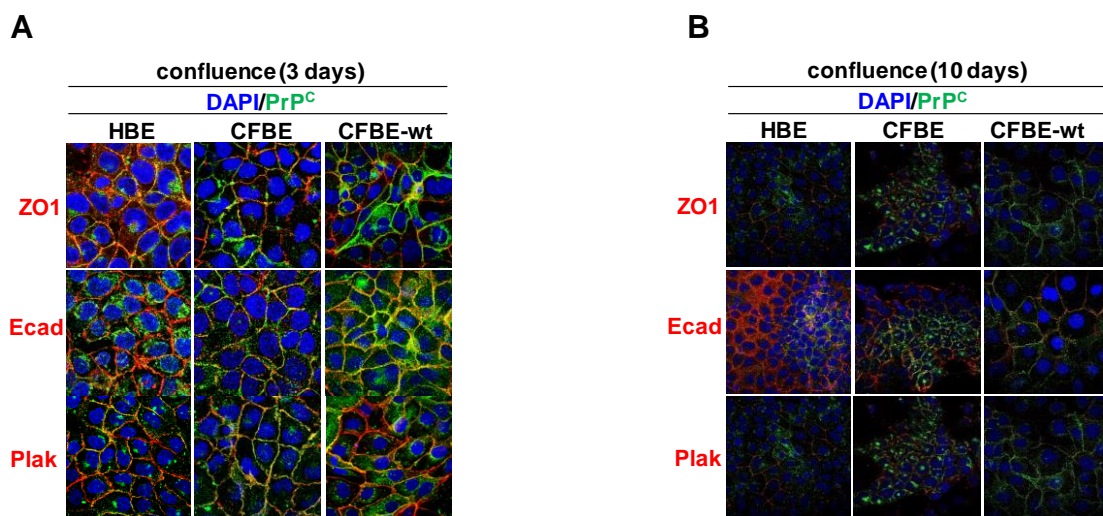


Figure 8

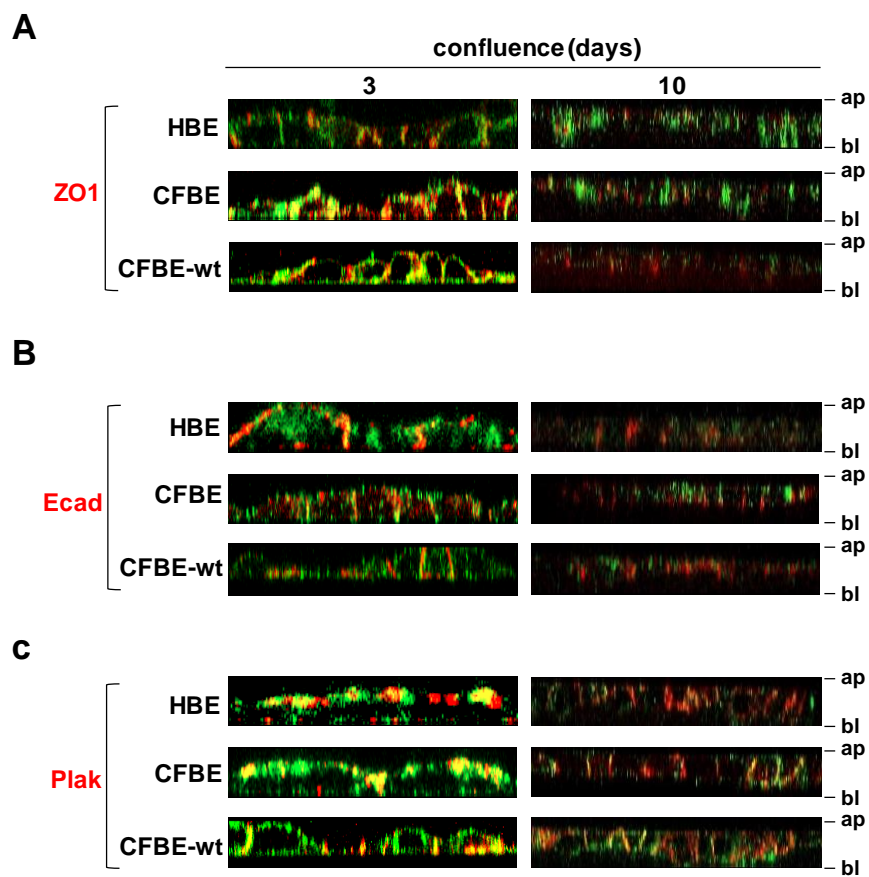


Figure 9

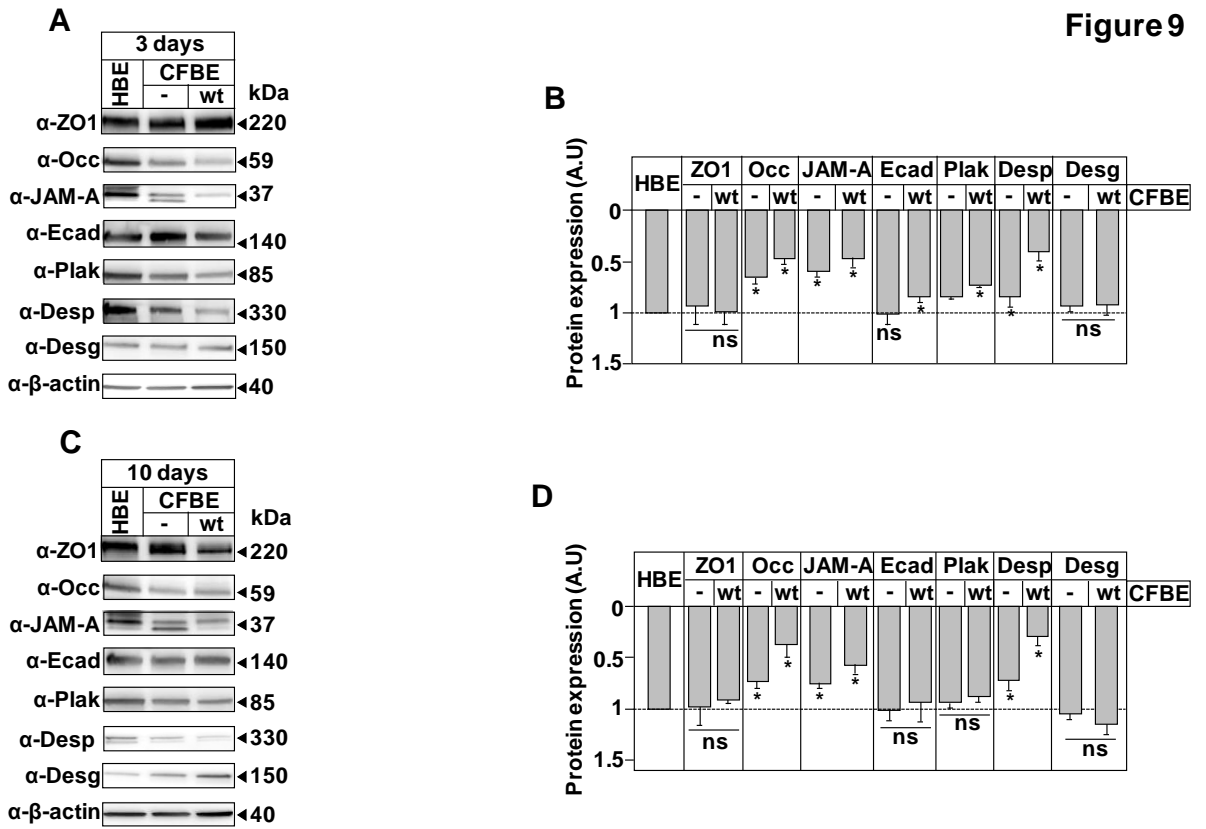
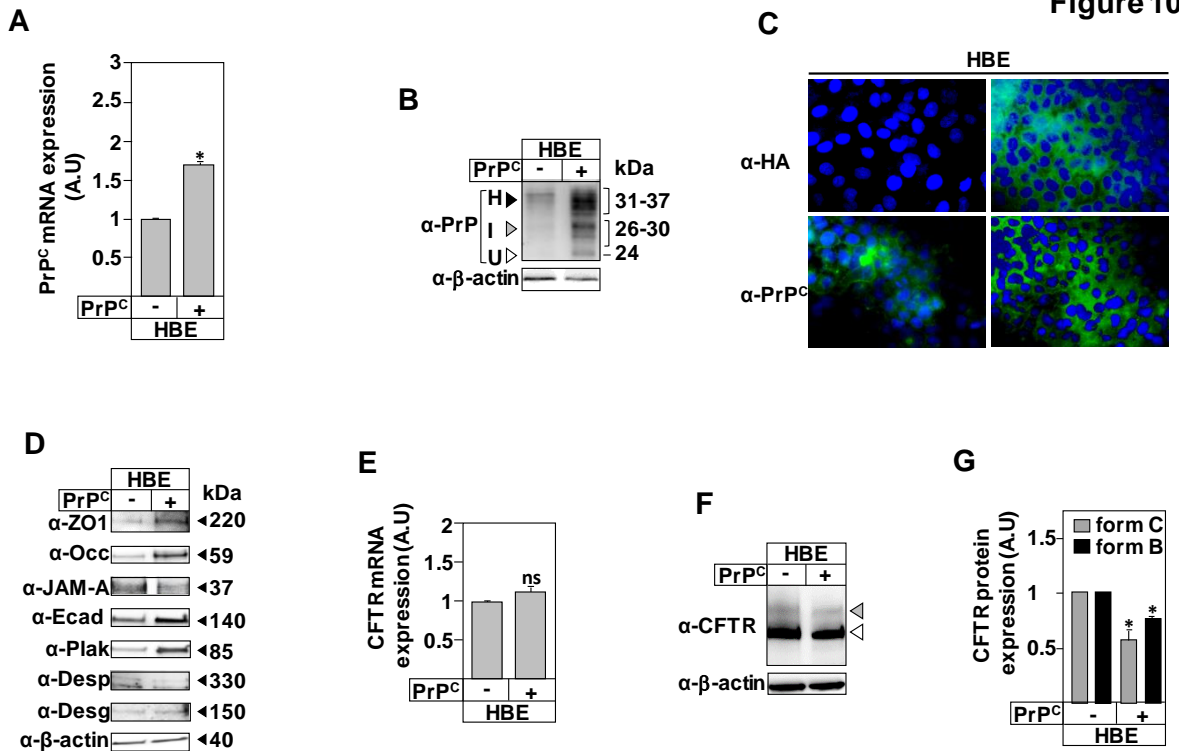


Figure 10



Tables

Table 1: Clinical characteristics of Control and CF subjects.

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

Table 2: Primers used for real-time (RT) PCR. FW: Forward, BW: Backward (reverse primer).

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
prnp	CAAGCCGAGTAAGCCAAAAACC	CACTGCCGAAATGTATGATGGG
cftr	AGCATTGCTGATTGCACAG	GAAAGAGCTTCACCCTGTCTG
ZO1	TGACAAACAGCCCTACCCAT	GTGTGTCATACCCAGGAGCT
Occ	TCCAGGCCTCTTGAAAGTCC	TGAGCATAGACAGGATCCGA
JAM-A	TAGTGCCCGAAGTGAAGGAG	ACACCAGGAATGACGAGGTC
E-cad	TGGACAGGGAGGATTTTGAG	ACCTGAGGCTTTGGATTCTT
Plak	ACTCTCCAACCTGACATGCA	GGTTGAGCAGCTTCACGATG
Desp	AAGGGCCTTGTTGACAGGAA	TGGTTAAATTCCTGACGCTGG
Desg	GGTGTCTGGAGCTGGAGTC	ACAGTGCTATGCTTGGTGAC
18S	AAACGGCTACCACATCCAAG	CCTCCAATGGATCCTCGTTA
GAPDH	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG	GGGGTCATTGATGGCAACAATA

Figure S1

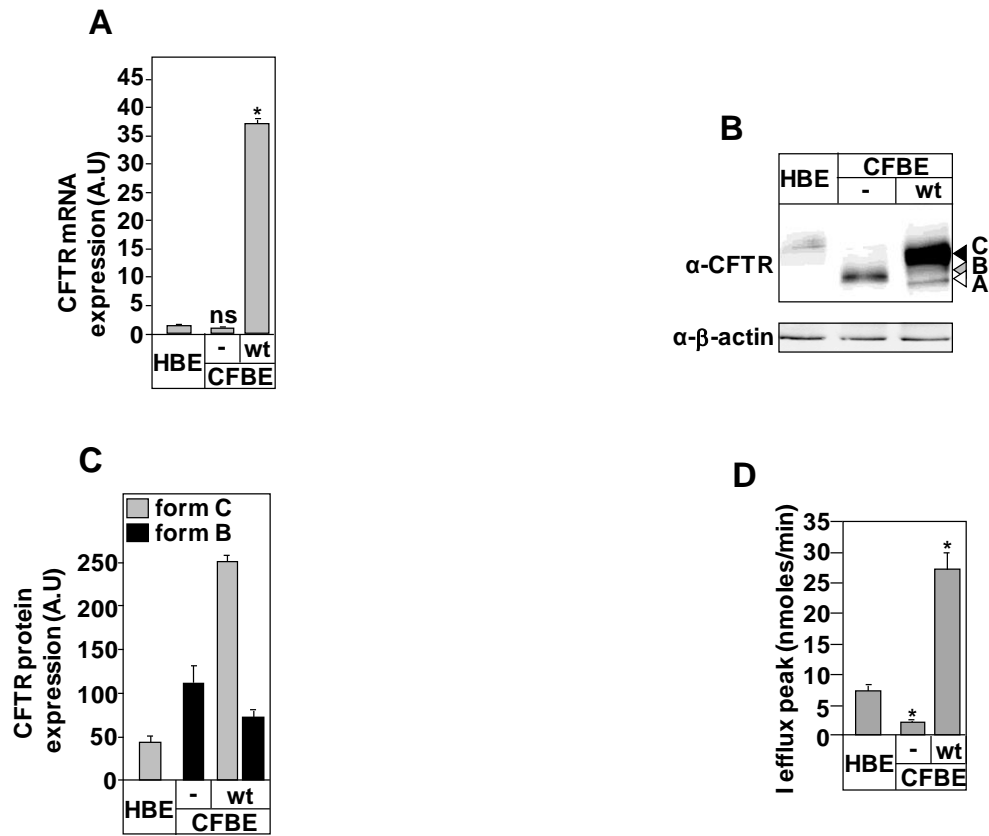


Figure S2

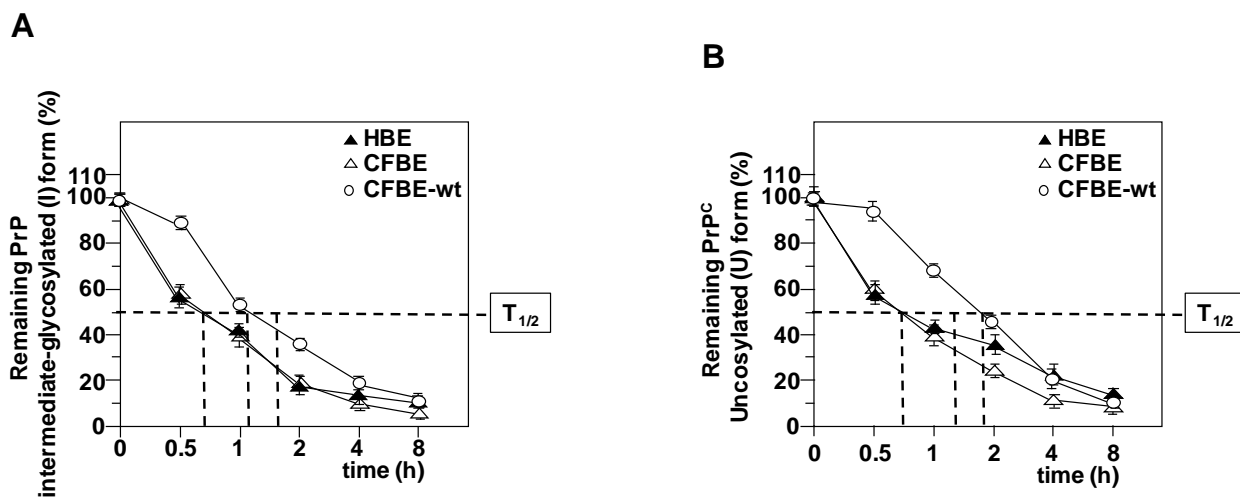


Figure S3

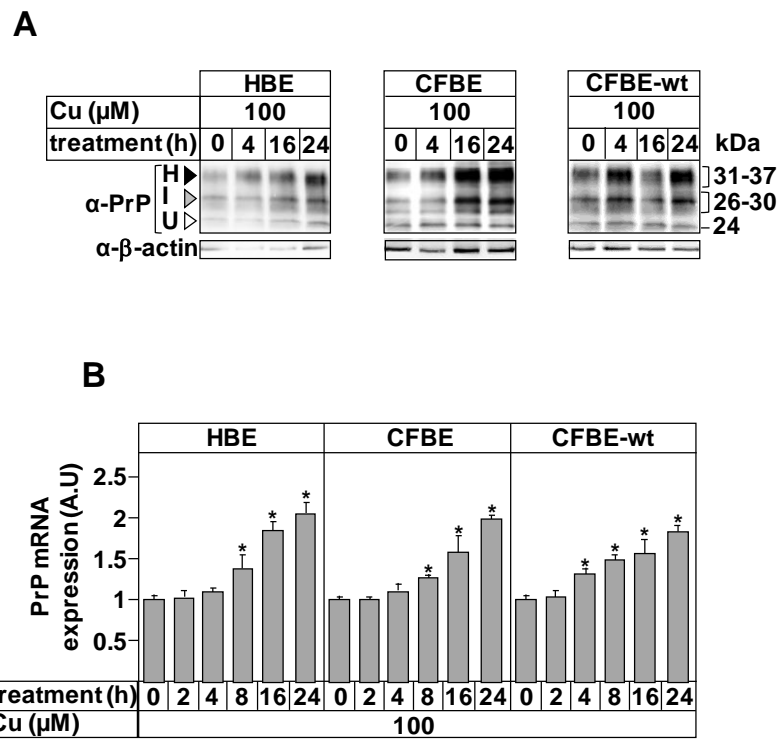


Figure S4

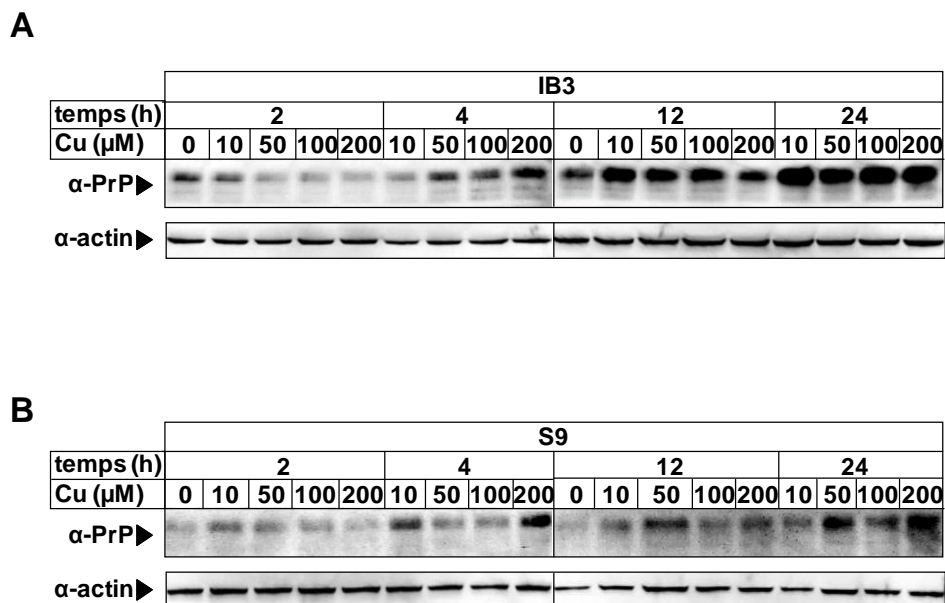


Figure S5

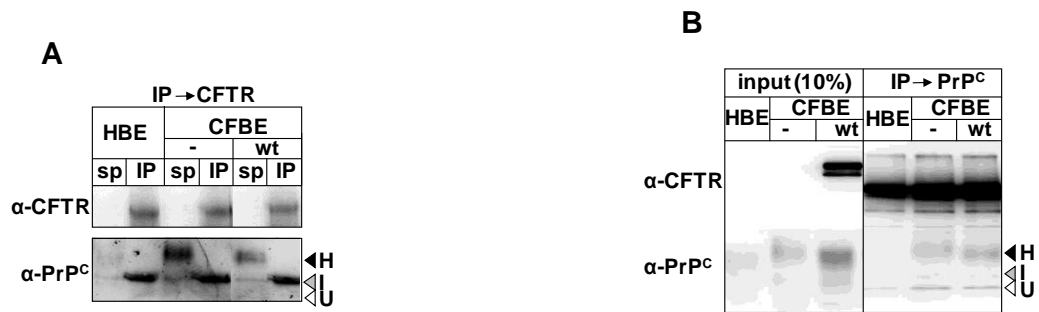


Figure S6

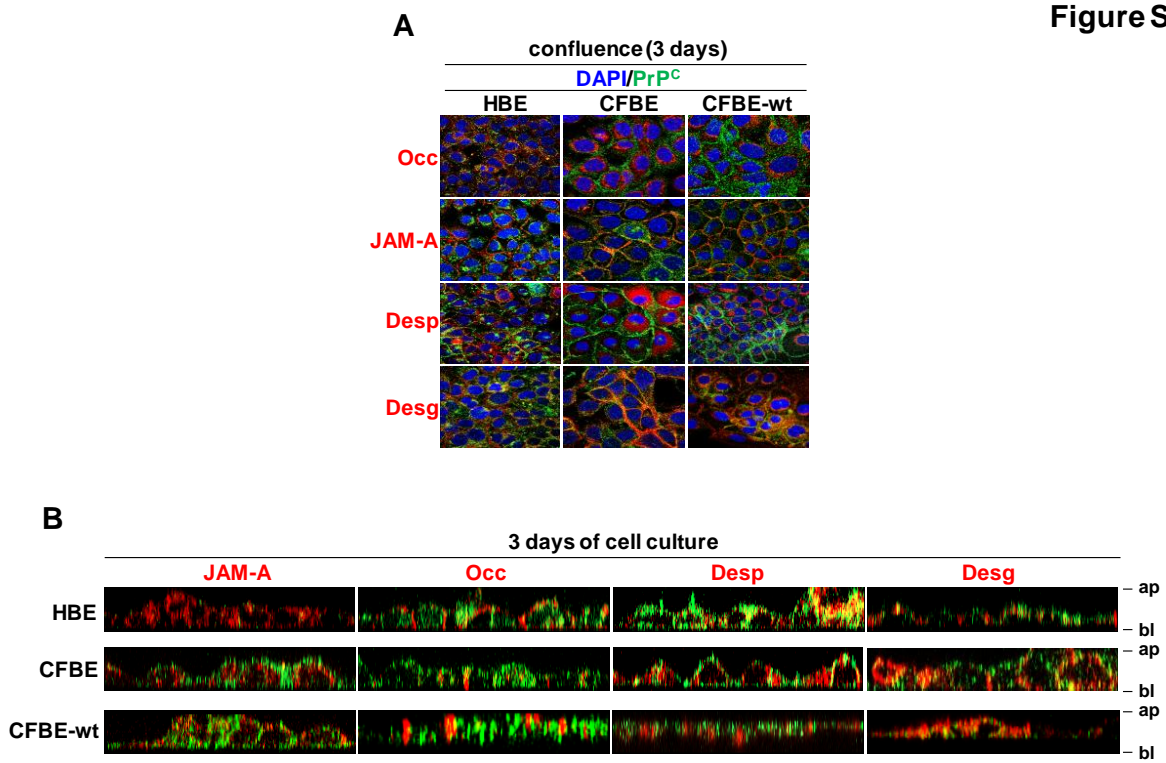


Figure S7

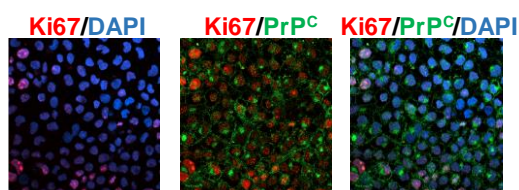


Figure S8

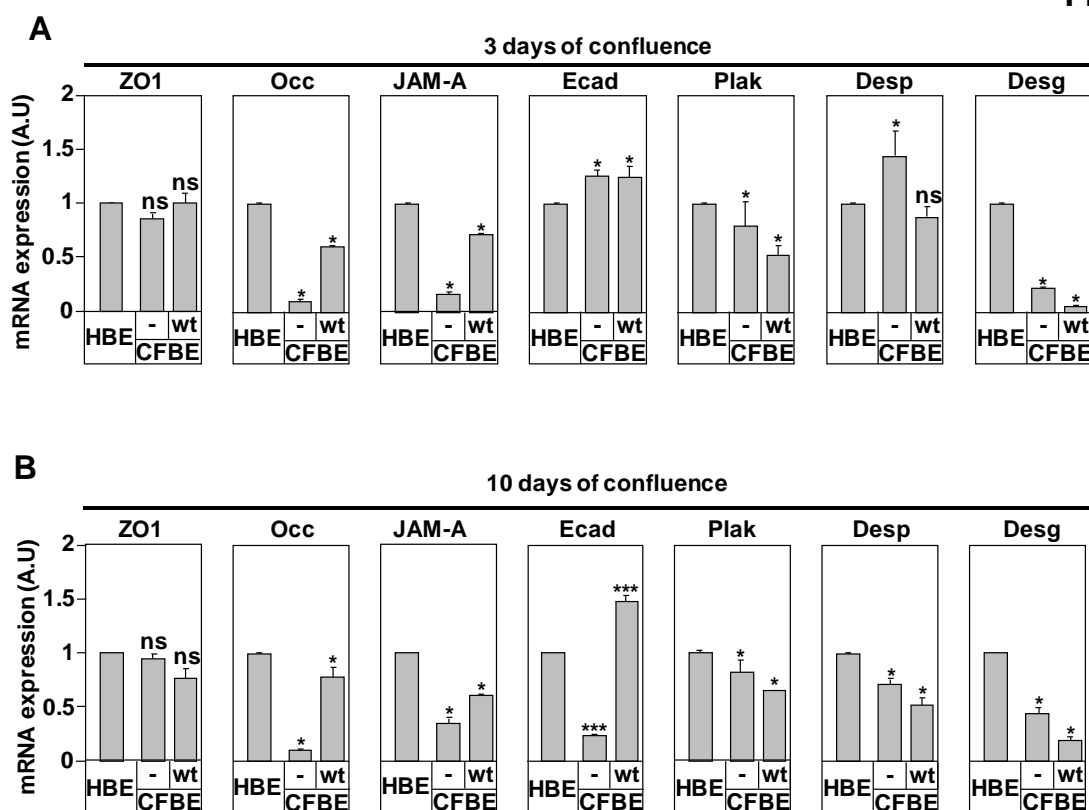


Table S1: Half-life of PrP^C protein forms calculated from the three graphs reported in figures 3D, 2S-A and 2S-B. H; hyper-, I; Intermediate-, U; Un-glycosylated forms.

Cell lines	Half-life ($t_{1/2}$)		
	H (min)	I (min)	U (in)
HBE	45	30	30
CFBE	90	40	40
CFBE-wt	90	80	80
CFBE-dF	180	100	100

Résultats : Article 2 – The cellular prion protein (PrP^C) contributes to the acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis mice.

II. Article 2 – The cellular prion protein (PrP^C) contributes to the acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis mice.

The cellular prion protein (PrP^C) contributes to the acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis mice.

Johanna Cormenier¹, Marianne Marchioni¹, Laurence Macari¹, Nicholas LeMaître³, Frederic Sergent³, Pierre Richaud⁴, Boubou Camara², Nadia Alfaidy³ and Mohamed Benharouga¹.

¹ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5249, CEA, IRIG, CBM, F-38000 Grenoble, France.

² Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose, Clinique Universitaire de Pneumologie - Pole Thorax et Vaisseaux, CHU de Grenoble, France.

³ Univ. Grenoble Alpes, INSERM U1036, CEA, IRIG, BCI, F-38000 Grenoble, France.

⁴ Univ. Aix-Marseille, CNRS, CEA, Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille (BIAM), UMR 7265, CEA Cadarache, Saint-Paul-lez Durance F-13108, France.

Cet article sera soumis à la revue "**Journal of Cystic Fibrosis**".

Résultats : Article 2 – The cellular prion protein (PrP^C) contributes to the acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis mice.

II.1. Contexte de l'étude

La mucoviscidose est une maladie génétique, récessive, et autosomale. Le gène *CFTR* responsable de la pathologie code pour une protéine transmembranaire appelée CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator). C'est une glycoprotéine canal chlorure exprimée au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales, où elle est aussi capable de réguler l'activité d'autres protéines membranaires ou cytoplasmiques. La délétion de la phénylalanine à la position 508 de CFTR (dF508) représente ~70% des mutations identifiées chez les patients et est responsable du blocage et de la dégradation rapide de CFTR- dF508 au niveau du réticulum endoplasmique. La mucoviscidose est une maladie qui atteint essentiellement les tissus épithéliaux exocrines. Les affections pulmonaires associées à un processus inflammatoire chronique sont la principale cause de mortalité chez les patients, dont les tissus respiratoires sont abondamment colonisés par des bactéries comme *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et surtout *Pseudomonas aeruginosa* (P.A), dans les stades tardifs de l'infection. Bien que de très nombreux travaux aient été consacrés à l'étude du gène *CFTR* et aux fonctions multiples de la protéine CFTR, l'origine de la surinfection pulmonaire surtout par P.A reste encore mal connue. Chez un individu en bonne santé, P.A est éliminée rapidement par la clairance mucociliaire, par les défenses immunitaires et par la présence d'une barrière épithéliale étanche dotée d'une grande capacité de réparation et de remodelage nécessaire au contrôle de la transmigration et de la dissémination des pathogènes. Dans la mucoviscidose, ces principaux facteurs de défenses de l'appareil respiratoire sont modifiés et les causes de dissémination restent encore très discutées. Dans un premier temps, la protéine CFTR a été incriminée, puis d'autres études, contradictoires, ont impliqué les protéines des jonctions intercellulaires. Même si aujourd'hui, il existe des liens entre CFTR et les protéines des jonctions, les mécanismes moléculaires responsables de la perte de l'étanchéité de la barrière épithéliale sont toujours inconnus. Parmi les protéines décrites récemment comme partenaires des protéines des jonctions adhérentes et desmosomes, il y'a la protéine prion cellulaire (PrP^C). Cependant, son rôle dans le maintien de la barrière épithéliale pulmonaire et dans la transmigration et la dissémination de P.A dans le contexte de la mucoviscidose reste encore inconnu.

Résultats : Article 2 – The cellular prion protein (PrP^C) contributes to the acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis mice.

II.2.Résultats

Nous avons réalisé des études *in vitro* en utilisant des cellules normales ; 16HBE14o- (HBE) et des cellules homozygotes pour la mutation dF508 ; CFBE41o- (CFBE), et des études *in vivo* sur des souris sauvages (wt) ou invalidées pour les gènes *Cftr* (CFTR^{-/-}) ou *Prnp* (PrP^{0/0}).

Le traitement des cellules avec la souche P.A-fluorescente et l'instillation nasale de P.A dans les trois modèles de souris étudiées nous ont permis d'évaluer les changements du poids des souris et des poumons, l'infiltration des cellules du système immunitaire (macrophages et neutrophiles), la dissémination bactérienne au niveau de la rate, les médiateurs inflammatoires systémiques, et les concentrations de certains métaux essentiels comme le zinc, le fer, le manganèse et le cuivre.

Les analyses par PCR quantitative, par immunoblot, par immunohistochimie, par test ELISA, et par ICP-MS pour les métaux nous ont permis de montrer que l'expression des protéines PrP^C et CFTR augmente dans les poumons des souris CFTR^{-/-} et PrP^{0/0}, respectivement. L'infection aigue avec P.A accentue cet effet et entraîne, par rapport aux souris témoins, **i)** l'augmentation de l'infiltration de cellules de l'inflammation dans les poumons, **ii)** l'augmentation de la dissémination de P.A dans la rate, **iii)** l'augmentation des taux circulants d'IL-1 β , IL-6 et TNF- α , et **vi)** la diminution des taux circulants d'IL-10. L'infection avec P.A perturbe également l'homéostasie des métaux chez les souris PrP^{0/0} et CFTR^{-/-}. Au niveau cellulaire, l'infection par P.A augmente aussi l'expression des protéines PrP^C et CFTR. Les mesures de la transmigration du P.A-fluorescent montrent une augmentation de la pénétration de ce pathogène dans les cellules CFBE par rapport aux HBE. Ce résultat est en parfaite corrélation avec la diminution de la résistance transépithéliale (RTE) dans les CFBE comparées aux cellules HBE.

Résultats : Article 2 – The cellular prion protein (PrP^C) contributes to the acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis mice.

II.3.Conclusions

Cette étude suggère que la protéine PrP^C joue un rôle important dans la transmigration et la dissémination de P.A dans les poumons au cours de la maladie de la mucoviscidose. L'augmentation de l'expression de la protéine PrP^C lors de l'infection à P.A perturbe la stabilité des protéines des jonctions adhérentes et des desmosomes ce qui impacte l'étanchéité de la barrière épithéliale pulmonaire.

The cellular prion protein (PrP^C) contributes to the acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis mice.

Johanna Cormenier¹, Marianne Marchioni¹, Laurence Macari¹, Nicolas LeMaître³, Frederic Sergent³, Pierre Richaud⁴, Boubou Camara², Nadia Alfaidy³ and Mohamed Benharouga¹.

¹ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5249, CEA, IRIG, CBM, F-38000 Grenoble, France.

² Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose, Clinique Universitaire de Pneumologie - Pôle Thorax et Vaisseaux, CHU de Grenoble, France.

³ Univ. Grenoble Alpes, INSERM U1036, CEA, IRIG, BCI, F-38000 Grenoble, France.

⁴ Univ. Aix-Marseille, CNRS, CEA, Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille (BIAM), UMR 7265, CEA Cadarache, Saint-Paul-les Durance F-13108, France.

Running Title: PrP^C in P.A infection

Keywords: CFTR, PrP^C, cystic fibrosis, junctional proteins, *Pseudomonas aeruginosa*, acute infection, inflammation, metal homeostasis

Address correspondence to:

Dr. Mohamed Benharouga

LCBM-UMR5249

DRF-BIG, CEA-Grenoble

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

Téléphone: (33)-4-38-78-44-51

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

E-mail: mohamed.benharouga@cea.fr

Abstract

Background:

In cystic fibrosis (CF), the permeability of the bronchial epithelial barrier (BEB) is abnormally increased, which contributes to *Pseudomonas aeruginosa* (P.A) transmigration, thought to be associated with exacerbated inflammatory responses. Recently, we reported the direct involvement of the cellular prion protein (PrP^C) in the control of bronchial epithelium permeability (BEP) through its interaction, stabilization and protection the adherens and desmosomes junctional proteins against metal induced oxidative stress. However, its role in the BEP in CF, particularly in the P.A transmigration and dissemination is still unknown.

Methods:

We investigated the responses of wild type (wt) and invalidated mice for *cftr* (CFTR^{-/-}) and *prnp* (PrP^{0/0}) genes to acute (24h) P.A infection, administered by nasal instillation. The host responses were assessed through the measurement of the body and lung weight changes, lung histology, spleen bacterial dissemination, systemic inflammatory mediators, and metals (zinc, iron, manganese and copper) concentrations.

Results:

Immunoblot and immunostaining analyses demonstrated that PrP^C and CFTR proteins were increased in the lungs of CFTR^{-/-} and PrP^{0/0} mice, respectively. P.A infection intensified this increase and caused, compared to the control mice, the rise of lung's inflammatory cells infiltration and PA dissemination to the spleen along with an increase in the levels of circulating IL-1 β , IL-6 and TNF- α and decreased in the systemic levels of IL-10. P.A infection also caused the perturbation of metals homeostasis in PrP^{0/0} CFTR^{-/-} mouse.

Conclusion:

This study demonstrated that PrP^C protein plays an important role in the lung P.A transmigration and dissemination in the CF disease. The increase in PrP^C expression upon P.A infection disturbed the stability of the junctional proteins, leading to increased BEP. Further studies are need to emphasize the mechanism by which PrP^C proteins controls P.A dissemination through the deregulation of the BEP in CF.

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is a fatal autosomal recessive disorder. The protein product that is defective or absent in CF patients is a cyclic AMP-regulated chloride ion channel called the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) [1]. In patients with CF, more than 2000 different mutations have been described in the CFTR gene database (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/Home.html>), although the deletion of three bases in exon 10 (dF508) is responsible for ~70 percent of all CF mutations [2]. The predominant symptoms of CF are associated with abnormalities of epithelial surfaces in the respiratory, digestive, and reproductive tracts [3]. In airway epithelial cells, the absence of Cl⁻ secretion results in chronic disease of the respiratory tract manifested by an airway obstruction, excessive, predominately neutrophilic, inflammatory response and recurrent infections of the lungs [4]. In CF, the lung is particularly susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* (P.A), the major contributor into the morbidity and mortality of at least 75% of patients [5]. However, it remains unclear whether CFTR dysfunction is the unique cause of the increased lung predisposition to infection with P.A, an opportunistic pathogen capable of inducing acute and chronic infections, or inappropriate inflammatory responses that generates a favorable lung environment for subsequent infection with P.A.

The internalization of P.A by epithelial respiratory cells has been shown to be independent of CFTR protein expression at the epithelial cell surface but rather depending on the cell polarity and junctional complex's (JC) integrity [6]. JC is tightly dependent on tight, adherens and desmosomes junctions, that provide high resistance, maintain epithelial cell polarity by separating cell's apical and basolateral domains and form a barrier between distinct biologic compartments. Infection of the respiratory tract by P.A was reported to increase with the decrease in the efficiency of the epithelial barrier [7], suggesting that epithelial junctions play an important role in the protection against P.A invasion [8].

The absence of cell polarization or the loss of epithelial barrier's integrity have also been reported to increase P.A invasion and its cytotoxic capacity [6] [9]. In addition, during the inflammation processes the junctional complexes are disturbed facilitating the access of the bacteria to the respiratory epithelium [10]. Other studies have also reported that P.A binds and elicits cytotoxicity by interacting with the basolateral membranes of epithelial cells. Fleiszig et al. [9] showed that all epithelial cell types were more susceptible to the bacteria colonization upon tight junction's disruption. In addition, both tissue injury and treatments that disturb tight junctions have been reported to increase P.A binding compared to intact epithelial cell layers [11] [12], supporting the hypothesis that epithelial junctional barrier

prevents airway disease by restricting access of bacteria to basolateral membranes. Lee et al [13] also reported that the P.A binding to the basolateral membrane was tightly dependent on the airway trans-epithelial resistance (TER). Altogether, these results emphasize the importance of lung epithelial barrier in the protection against P.A invasion in the context of CF. Yet, the molecular mechanisms underlying P.A transmigration through the lung epithelial barrier remain elusive. The fact that P.A infection occurs in a beforehand established pathological settings suggests that specific biological events were engaged to facilitate bacterial dissemination. Recently, we demonstrated that the cellular prion protein (PrP^C) is expressed in the lateral membrane of human bronchial epithelial cells where it interacts and protects adherens and desmosomes junction proteins against oxidative stress [14]. We also demonstrated that PrP^C is upregulated in CF as consequence of its CFTR-associated mislocalization [15]. The PrP^C upregulation downregulates CFTR expression and participates in the loss of the lung epithelial barrier observed in CF [15]. PrP^C is a membrane glycoprotein that is expressed in all cell types [14]. The variety of functions that have been proposed for PrP^C include oxidative stress, immune modulation, differentiation, translocation of metals, such as copper, alteration of copper, zinc and iron homeostasis in the brain, cell adhesion and transmembrane signaling [16]. However, the role of PrP^C protein in the lung transmigration of P.A in normal and CF is still unknown.

To investigate the relationship between P.A transmigration across polarized epithelial respiratory cells and CFTR and PrP^C protein's expression, we analyzed using wild type (wt) and invalidated mice for PrP^C (PrP^{-/-}) or CFTR (*Cftr*^{tm1Unc}) genes, the impact of lung acute P.A infection on *i*) PrP^C, CFTR, and junctional proteins expression, *ii*) P.A dissemination, *iii*) tissue and systemic inflammation and *vi*) essential metal homeostasis (copper, iron, manganese and iron).

We demonstrated that the invalidation of PrP^C gene increased the expression of CFTR and the lung sensitivity to P.A infection, causing an inflammatory response and the perturbation of the metal homeostasis.

Materials and Methods

Mice

Eight- to ten-weeks-old male and female wild-type (wt) C57Bl/6, PrP-knockout (PrP^{0/0}) [17], and CFTR^{-/-} (CFTR^{tm1Unc}) [18] mice were obtained from the French National Center of Scientific Research for animal Archive (Orleans, France), and maintained under specific pathogen-free conditions in the animal facility of IRIG institute (CEA-Grenoble, France) in accordance with institutional guidelines. PrP^C and CFTR knockout mice were backcrossed on C57Bl/6 [17] [18] and genotypes were confirmed by polymerase chain reaction amplification of tail snip DNA every 6 months in accordance with the full set of recommendations from the Federation of European Laboratory Animal Science Associations. Experiments were performed with 8- to 10-weeks-old mice. CFTR^{-/-} mice were supplied continuously in their drinking water with 6% of Movicool®.

Ethics Statement

All protocols in this study were conducted in strict accordance with the French guidelines for the care and use of laboratory animals. The protocols for mouse infection were approved by the animal research committee of the institute (CETEA, project number 17-067) and the French Ministry of Research.

Experimental in vivo model of acute infection with Pseudomonas aeruginosa (PAO1F)

Bacteria from exponential growth (OD = 1.0) were centrifuged and resuspended in sterile PBS at $1.7 \cdot 10^8$ per mL. Mice were anesthetized by intraperitoneal administration of a mixture of xylazine (10mg/kg) and ketamine (50mg/kg) and were weighed before infection. Then, 30µL of bacterial suspension ($5 \cdot 10^6$ bacteria/mL) were dropped into the mouse nostrils. Mice were euthanized by CO₂ inhalation after 24h of infection and were weighed. Blood was sampled from heart, spleen were isolated for bacterial dissemination, and lungs were isolated for protein and RNA extraction and for the evaluation of metals concentration. For histological analyses, mice were anesthetized with isoflurane, tracheal injected with 4% paraformaldehyde (PFA) and the lungs isolated and placed in the same solution for 24h.

Airway Epithelial Cell Culture

Transformed cell line 16HBE14o- (HBE) and the cystic fibrosis bronchial epithelial cells; CFBE41o- (CFBE) [19], kindly provided by Dr. D. C. Gruenert (University of California, CA), were cultured in MEM (Modified Eagle's Medium) medium (Sigma Aldrich, France) containing 10% fetal bovine serum (Eurobio, France). Cell cultures were performed at 37°C in a 5% CO₂/air atmosphere.

Transepithelial resistance (TER) measurements

HBE cells were grown on porous polycarbonate membranes (Transwell), and their TER was measured using the Millicell-ERS Resistance system (Millipore, Bedford, MA). The TER (ohms/cm²) was calculated from the following equation: (TER_{sample} - TER_{blank}) x surface area.

Bacterial Internalization Assays

To evaluate the bacterial invasion on HBE and CFBE cells monolayer, the cells were cultured on 0.4µm pore polycarbonate membrane. The cells were infected with 10 MOI (Multiplicity Of Infection) of *Pseudomonas aeruginosa* (10⁸ cfu/ml) strains O1 (PAO1) constitutively expressing green fluorescent protein (PAO1-GFP). After 4h of incubation at 37°C, the cells were washed for 20 min with culture medium containing gentamycin (300µg/ml) in order to kill the bacteria around the cells. The gentamycin-containing medium was removed, the cells were washed with PBS and were fixed with 10% formalin for 20min. The filters were cut, mounted on the coverslip, and cells were visualized using fluorescence microscope. The level of bacterial invasion was quantified by counting the number of fluorescent bacteria present in cells. This value was corrected by making the ratio "number of bacteria / number of nuclei" and normalized in percentage to cell control HBE.

Lung histopathology

Mouse lungs were fixed in 10% neutral buffered formalin by inflation-immersion and embedded in paraffin. 5µm paraffin-embedded sections were incubated with anti-PrP (SAF32, Bertin-Pharma) or anti-CFTR (M3A7, Santa Cruz) antibodies. Immunopositive staining was detected using a Neostain ABC kit and HRP-mouse using DAB (3, 3'-diaminobenzidine) as the chromogen (NeoBiotech). Slides were counterstained using hematoxylin (Sigma Aldrich). Control sections were treated with the secondary antibody alone.

Lungs protein extraction, electrophoresis and immunoblotting:

Mouse lungs were ground with ceramic beads and 200µL of 1X RIPA buffer added with protease inhibitors (10 mM PMSF, 1µM leupeptin/pepstatin A and 2mg/ml of iodoacetamide) 3 times 30sec at 5000U in a MagNA lyzer (Roche). Protein concentrations were measured using the Micro BCA protein assay kit (Sigma Aldrich). Protein samples were denaturated in 2X Laemelli Sample Buffer (LSB), subjected to a 10% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad) and probed with corresponding primary anti-PrP (SAF32, Bertin-Pharma), anti-CFTR 24.1 (R&D system), anti-ZO1

(Invitrogen), anti-occludin (Sigma Aldrich), anti-E-cadherin (Takara), anti- β -catenin (Sigma Aldrich), anti-plakoglobin (Abcam), anti-desmoplakin (Abcam), or anti- β -actin (Sigma Aldrich) antibodies. The antigen-antibody reaction was revealed using IgG antibody coupled to HRP (Covalab) and developed with ECL (Bio-Rad) using Fusion FX7 (Vilbert Lourmat).

Lungs RNA extraction and RT-qPCR

Mouse lungs were ground with ceramic beads and 1mL of trizol, 3 times 30sec at 5000U in a MagNA lyzer (Roche). RNA were precipitated with chloroform and isopropanol and were washed with ethanol. RNA concentration was measured using Nanodrop (Thermo Fisher). 1 μ g of the RNA was reverse transcribed with iScript™ cDNA Synthesis kit (BioRad). The qPCR was performed using the following *prnp* or *cfr* primers (Table 1) and GoTaq® qPCR Master Mix provided by Promega. mRNA expression was quantified by real-time RT-qPCR using CFX96™ Real-Time detection system (Biorad) and normalized to housekeeping genes *18S* and *actin*.

Cytokine secretion by sandwich ELISA

Systemic levels of interleukins (IL)-1 β , IL-6, IL-10 and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) were assayed using a quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Peprotech). The results were normalized per g of mouse body weight.

PMNs and macrophages quantification in mouse lungs

The degree of inflammation in the surface epithelium was evaluated by counting the number of inflammatory cells in the epithelium. Hematoxylin and eosin staining were performed on lung sections. PMNs and macrophages were quantified using X40 magnification. Cells were counted on ten fields per slide. For each condition, at least three different slides were used and the mean \pm SE was calculated.

Bacterial dissemination:

To study bacterial dissemination, spleens were isolated on euthanized mice. Spleens were homogenized in PBS with a Polytron. *Pseudomonas aeruginosa* CFU were determined by plating of serial dilutions and colony counting on pseudomonas *aeruginosa* isolation Agar (Sigma Aldrich) plates. The CFU were calculated for the total organs and normalized per g of mouse.

Metal concentrations in the mouse organs

To evaluate the copper, iron and zinc concentrations, lungs and liver were isolated from mice. The organs were weighed before to dry it overnight at 50°C. Dried organs were mineralized in 70% nitric acid before analysis with Inductively Coupled Plasma-Mass

Spectrometry (ICP-MS). The metal content (μg) was reported to the total mass of the dry organ and was normalized per g of mouse.

Statistical analysis:

All experiments were repeated three times. Results are presented as means \pm standard deviation. A Student's t test was used to compare means, and $P < 0.05$ was considered significant.

Table 1: List of primers

gene	Primer forward 5'→3'	Primer reverse 5'→3'
<i>cfr</i>	AGCATTGCTGATTGCACAG	GAAAGAGCTTCACCCTGTCTG
<i>prnp</i>	CAAGCCGAGTAAGCCAAAAACC	CACTGCCGAAATGTATGATGGG
<i>18S</i>	AAACGGCTACCACATCCAAG	CCTCCAATGGATCCTCGTTA
<i>actin</i>	GAGAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACC	TAGCACAGCCTGGATAGCACCGTA

Results

P.A Internalization is increased in CF bronchial epithelial Cells

We and other groups have demonstrated that the absence of CFTR at the plasma membrane, but not its Cl⁻ channel activity, affects the tightness of airway epithelial barrier [15] [20]. Also, CFBE cells have been reported to exhibit a decrease in the TER compared to the control cells, HBE [21]. To confirm these results we measured the TER using 10 days cultured CFBE and HBE cells. The results show a significant decrease in the CFBE TER compared to HBE cells (Fig. 1A). We used the same conditions to evaluate the invasion of P.A in CFBE and HBE cells grown on pre-coated polycarbonate filter. Cells were then exposed to the PAO1F-GFP strain used at 10⁸ CFU/ml. The bacteria were added to the apical side for 4h at 37°C. After gentamicin wash, we observed more fluorescent P.A in CFBE compared to the HBE cells (Fig. 1B). The quantification of fluorescent bacteria using ImageJ indicated an increase of ~1.8 fold in CFBE compared to the HBE cells (Fig. 1C). Using similar conditions, we assessed the relationship between PrP^C and P.A infection. Treatment with increasing volume (100, 250 and 500 µl) of PAO1F-GFP strain culture (10⁸ CFU/ml) gradually increased the expression of the three specific forms (H, I and U) of PrP^C protein (Fig. 1D). P.A infection of mice was also performed to determine its effect on PrP^C expression. Nasal infection with PBS containing 5.10⁵ cfu/ml of PAO1-GFP strain of control mice (C57BL/6) for 24h also showed an increase in PrP^C expression in bronchial samples compared to the PBS-inhaled mice (Fig. 1E). These results demonstrate that in both *in vitro* and *in vivo* studies, PrP^C protein expression is increased in response to bacteria lung infection.

PrP gene invalidation increases CFTR expression

Since PrP^C expression is upregulated in CF and its overexpression decreases the expression of wt-CFTR without physical interaction [15], we hypothesized that both proteins affect their mutual expressions through an unknown mechanisms. To better characterize the related regulations between PrP^C and CFTR, we determined the levels of expression of the CFTR protein in the PrP knockout mouse model (PrP^{0/0}). Because sex differences have been reported to influence protein expression, we first verified using RT-qPCR (Fig. 2A) and genomic sequencing analyses (data not shown) that in our mice breeding conditions the PrP^C mRNA levels were not sex-dependent (Fig. 2A). Using the PrP^{0/0} mice model, we demonstrated that the levels of CFTR mRNA did not change compared to the wild type (wt) mice (Fig. 2B). However, using immunoblot analysis we demonstrated that the CFTR

expression increased significantly in the bronchial samples of the PrP^{0/0} mice compared to the controls (Fig. 2C).

The levels of expression of CFTR were quantified using ImageJ and showed an increase of ~2.5 fold in PrP^{0/0} compared to the control mouse (Fig. 2D). The immunoblot results of figure 2C also confirmed the biochemical expression profile of PrP^C in wt-mouse, and showed that only the unglycosylated (U) form of PrP^C protein could be detected in the bronchial samples of PrP^{0/0} (Fig. 2C). Finally, we confirmed that PrP^C and CFTR proteins expression are increased in the upper airway of wt-, PrP^{0/0}, and CFTR^{-/-} mouse models following lung P.A acute infection (Fig. 2E). Additionally, we demonstrate that P.A infection increase the expression of the tested junctional proteins, except for plakoglobin which expression was increased (Fig. 2E).

Body and lung Weights before and after P.A infection

The mouse models used in the study were 8 weeks of age. At this age, wt and PrP^{0/0} mice did not show any significant difference in their body weight (Fig. 4A). However, CFTR^{-/-} model showed lower (17g ± 0.5) body weight compared to wt mice (22g ± 0.3). Acute infection using P.A did not affect the body in both groups. Surprisingly, PrP^{0/0} showed an increase in the weight of their lungs (13.8g ± 0.8) compared to wt (10.1g ± 0.5) and CFTR^{-/-} mouse (10.9g ± 0.8) (Fig. 4B).

In situ expression of PrP^C and CFTR proteins in the lungs of the CFTR^{-/-} and PrP^{0/0} mice.

mRNA and protein analyses of lung tissues collected from CFTR^{0/0} and PrP^{0/0} mice suggested that CFTR and PrP^C proteins were inversely regulated. To verify whether these results also apply *in situ* in the lung of CFTR^{-/-} and PrP^{0/0} mice, we conducted immunohistochemistry analyses to compare the expression levels of PrP and CFTR proteins. Fig 3A.b shows that CFTR protein was highly expressed in the bronchial tissue of PrP^{0/0} mice and that the expression of the PrP^C protein was highly increased in the bronchial tissue of CFTR^{0/0} mice (Fig 3A, f, a, d) 3Aa and Fig 3Ad report CFTR and PrP^C expression in wt lung mice. Fig 3A-c and Fig 3A-e report CFTR and PrP^C expression in CFTR^{-/-} and PrP^{0/0} lung mice, respectively. Fig3B reports the same immunohistochemistry tests in the lung of mice that were infected by P.A for 24h. The same increases in the expression of CFTR and PrP^C proteins were observed in the lungs of the PrP^{0/0} CFTR^{-/-} mice, respectively.

***Pseudomonas aeruginosa* dissemination**

Previous studies have shown that P.A can disseminate into the mice spleen and liver following lung infection [22]. Hence, we determined whether this process is also occurring in our mouse models, following 24h lung infection with PAO1F strain. Bacterial dissemination was evaluated by CFU counting (Fig. 4C). We observed significant increases in numbers of disseminated populations of PAO1F in the spleen of CFTR^{-/-} and PrP^{0/0} mice compared to the wt-mice (Fig. 4C). PAO1F strain was hardly detected in the blood (data not shown), suggesting that the bacteria accumulated in spleen rather than remaining in a bactericidal environment. Moreover, the hematoxylin-eosin staining of mice lung sections did not show any significant accumulation of P.A in the bronchial airways (Fig. 3B, 5A) indicating that the bacteria crossed into the lung tissues.

Systemic inflammatory profiles of lung-infected mice

P.A pulmonary infections is characterized by a rapid recruitment of neutrophil and macrophages into the lung tissue and by an increase in the local and systemic inflammatory responses. Hence, we first evaluated the degree of airway's macrophage and neutrophil infiltration following 24h infection with PAO1F strain. Hematoxylin-eosin staining of the lungs of the three mice models and analyses of the macrophages and neutrophil counts showed that only PrP^{0/0} mice exhibited an increase in macrophage number (9 ± 0.03) compared to wt (2 ± 0.01) and CFTR^{-/-} (3 ± 0.04) (Fig. 5A and B). The number of neutrophil increased both in PrP^{0/0} and CFTR^{-/-} compared to wt-mice (Fig. 5A and B). These results demonstrated that in CF the PrP^C protein is necessary for lung neutrophil recruitment upon P.A infection. Regarding the inflammatory response, we observed an elevation of the proinflammatory mediators, IL-6, IL-1 β , and TNF- α ($p < 0.05$) in the sera of mice infected with P.A compared to control mice. No difference could be observed in CFTR^{-/-} (Fig. 6A, B, and C). Importantly, we observed that the anti-inflammatory cytokine IL-10, was significantly decreased in wt, PrP^{0/0} and CFTR^{-/-} mice infected with P.A, compared to non-infected mice (Fig. 6D).

Acute P.A infection disturbed the lung metal homeostasis

Copper homeostasis has been reported to be finely regulated in bronchial cells [14]. PrP^C binds five copper ions with high affinity and participate in the regulation of its homeostasis [23]. Disruption in copper physiological concentrations has also been reported to causes perturbation in the homeostasis of other key metals such as manganese (Mn), iron (Fe) and zinc (Zn) [24]. Because PrP^C expression increased in CF disease [15] and in lung of the CFTR^{-/-} mice model, we evaluated Cu, Mn, Fe and Zn concentrations in the sera samples

collected from wt, PrP^{0/0}, and CFTR^{-/-} mice. Using ICP-MS analysis we demonstrated that Cu concentration in wt-mice was (~12 µg/g of mice) and that this amount did not vary significantly following P.A infection (~10.8 µg/g of mice) (Fig. 7A). However, both in PrP^{0/0} and CFTR^{-/-} models, P.A infection decreased the lung Cu content to 8 and 8.5 µg/g of mice body weight, respectively (Fig. 7A). Similar results were obtained for Fe in the lung of the PrP^{0/0} mice (Fig. 7B) and for Mn in the lung of all three tested mouse models (Fig. 7C). No change was observed for Zn concentrations in all mouse models compared to non-infected mice (Fig. 7D). Interestingly, compared to the wt-mice, Cu content increased from ~12 to ~15 µg/g of mice body weight in the lung samples of CFTR^{-/-} mice. The invalidation of *prnp* gene also affected Mn concentration, that decreased from 1 to 0.75 µg/g of mice body weight (Fig. 7A and C).

Acute P.A infection disturbed the hepatic metal homeostasis

We showed that P.A infection during 24h caused bacteria dissemination to spleen. Other groups have also reported that under the same conditions, P.A dissemination can reach the liver [25]. Hence, we conducted similar analyses on livers collected from wt, PrP^{0/0} and CFTR^{-/-} mice models (Fig. 8). The hepatic Cu content was decreased in PrP^{0/0} mice (6 ± 0.4 µg/g of mice body weight) compared to wt and CFTR^{-/-} mice (16 ± 1.3 µg/g of mice body weight) (Fig. 8A). However, P.A infection significantly increased copper content to reach 19 ± 1.1 µg/g of mice body weight (Fig. 8A). For hepatic iron, similar results as those observed in lung PrP^{0/0} were obtained (Fig. 8B). The content of Fe was 450 ± 5 µg/g of mice body weight before infection and decreased to 330 ± 2.5 µg/g of mice body weight following 24h P.A infection (Fig. 8B). Regarding Mn, only CFTR^{-/-} mice showed high levels (5.2 ± 0.2 µg/g mice body weight) compared to wt- and PrP^{0/0} (3.8 ± 0.4 µg/g of mice body weight) that decreased to 4.2 ± 0.1 µg/g mice body weight upon P.A infection (Fig. 8C). Finally, P.A infection significantly increased Zn content in hepatic samples as reported in figure 8D. These results strongly suggest that P.A infection for 24h was able to perturb the homeostasis of key metal elements not only at the lung level's but also in the tissues where P.A disseminates to, such as the liver (Fig. 8).

Discussion

In CF, the precise molecular mechanisms that allows the transmigration of P.A and inflammatory cells through the bronchial epithelial barrier are still elusive. This barrier relies on the establishment and maintenance of functional cell-cell junctions that depends among other proteins on the normal function of the PrP^C protein [14]. Here, we used a CF cell line (CFBE) and PrP^{0/0} and CFTR^{-/-} mice models to study the impact of the gain or loss in the PrP^C protein expression on P.A invasion and to determine the consequences on the systemic inflammatory responses and the homeostasis of essential metals such as Zn, Fe, Cu and Mn.

Using cultured CFBE cells we showed that despite increased expression of PrP^C, the TER was diminished and P.A invasion was increased. These results are in line with previous reports demonstrating that PrP^C protein is not correctly targeted to the lateral membrane in CFBE cells, where disturbed expression of key junctional proteins was also observed [15]. These data substantiated the CFTR involvement in the normal distribution of junctional complexes and support previous finding showing that P.A internalization by epithelial respiratory cells depends on cell polarity and junctional complexes integrity [26].

The confirmation of these assumptions also came from the PrP^{0/0} and CFTR^{-/-} mouse models studies. Both models have extensively been used to investigate the physiopathological functions of PrP^C and CFTR, respectively [26] [27]. The present study took advantages from the opposite expressions of PrP^C and CFTR proteins in a way that PrP^{0/0} expressed high levels of CFTR and CFTR^{-/-} expressed high levels of PrP^C (Fig. 2C and 2E). Hence, each model served to determine the impact of the invalidated protein on the overexpressed of the other one in relation to P.A invasion. Compared to the PrP^{0/0}, the CFTR^{-/-} mouse model was broadly used to study P.A infection, although it lacks the pulmonary pathophysiology, while developing severe gastrointestinal abnormalities [28]. We used the intranasal administration of P.A strain in mice to mimic an acute pneumonia model. This method allows acute lung infection when rapid clearance of the bacteria occurs or acute sepsis and death [28] [29]. Using P.A intranasal delivery method, we did not observe any mortality after 24h, even in CFTR^{-/-} mouse model known for its fragility due to intestinal obstruction syndrome [30]. However, as reported previously [18], the body weight of CFTR^{-/-} mice at eight weeks was lower compared to wt and PrP^{0/0} mice, hence this parameter was take into account for the data analysis. Interestingly, the weight of the lungs was high in PrP^{0/0} compared to wt and CFTR^{-/-} mice, suggesting a potential failure in the respiratory system requiring an increase in the lung size. However, association between

PrP^C expression and basal ventilation was reported in adult mice [31]. Mice lacking or overexpressing PrP^C did not show any modification in their resting ventilatory patterns or in the chemosensory responses when awake and under urethane anesthesia [31].

Following P.A infection, we demonstrated that the levels of expression of PrP^C and CFTR proteins increased in HBE cells and in the lung samples prepared from the infected mice models. The role of PrP^C in relation to infection has been reported in the neuron system for the viral and for the infectious form of PrP^C, the PrP scrapie, (PrP^{Sc}) [32] [33]. The CFTR^{-/-} mice model has mainly been used to understand the mechanisms of lung infection by P.A. Even if in this model, no CF symptoms were observed in the lungs compared to the ones observed in CF patients [30]. In this mouse model, however, the abnormality reported for the airways was confined to the upper airways and the findings were somewhat surprising as the mice exhibited marked atrophy of the serous gland tissue in the dorsolateral sinus [18]. Other studies have reported nasolacrimal gland distension in this CF mouse model [30] or distension of the submucosal glands (upper trachea) [30], along with dilation of the submucosal gland ducts but no acinar hyperplasia [18].

The results obtained using the mouse models strongly suggest that both proteins are important for the transmigration of P.A. The P.A internalization results found in CFBE cells that do not express CFTR protein at their apical membrane and in the CFTR^{-/-} mice model that showed a high level of bacteria dissemination after a short incubation period are in contrast with previous reports [34] [35] but in total agreement with results reported in other studies [20] [21] [36]. In the latter study, binding and internalization of P.A by different cell lines carrying dF508 mutation were significantly higher compared to normal non-CF cells, suggesting that neither adherence nor internalization of P.A depends on bacterial interaction with apically expressed CFTR protein. In addition, non-polarized epithelial cells do not express CFTR at their apical membranes but are highly susceptible to P.A adherence, invasion, and survival [20].

The P.A infection of the lung was shown to be associated with increased inflammatory reaction as early as 24 h [37]. Several line of evidences suggest that mice with defective CFTR develop exaggerated inflammation compared with wt control animals in response to P.A [38], and that repeated intranasal applications of *B. cepacia* have led to chronic lung infection in CFTR-deficient mice, similar to the one observed in patients with CF [38].

In our study, similar results were found. In the PrP^{0/0} mouse model we observed an increase in the circulating levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α , indicating a generalized inflammatory response upon P.A dissemination. In the CFTR^{-/-} mouse model the degree of inflammation

was so high that P.A infection did not induce further increase. These results are in line with previous reports [38].

Importantly, in the three tested mouse models, the circulating levels of IL-10 were significantly decreased, particularly in the PrP^{0/0} and CFTR^{-/-} mouse models, demonstrating that P.A lung infection also affected the anti-inflammatory responses. IL-10 has also been reported to regulate the inflammatory response to P.A upon endo-bronchial infection [39]. Recent data also showed that the PAOIF strain triggered higher IL-1 β and TNF- α responses [25].

The increased number of inflammatory cells, such as neutrophils found within the lung section, confirmed the increased inflammatory response observed in the mice blood stream. Bacterial infection and inflammatory responses have recently been reported to be affected by copper homeostasis. Importantly, the PrP^C N-terminal tail contains 5 octapeptide repeats domains that can trap 4 to 5 copper (II) ions, which can alter the redox potential of copper [40]. We found that P.A infection decreased Cu concentration in PrP^{0/0} and CFTR^{-/-} mice models and that this deregulation perturbed iron and manganese but not zinc homeostasis. These results are the first to report metal deregulation in the CFTR^{-/-} and PrP^{0/0} mouse models following P.A acute infection. The loss of metal homeostasis and particularly that of zinc in the liver of both mouse models substantiated the toxic consequences that might have PA transmigration.

We previously identified PrP^C as a partner of adherens and desmosomal proteins [14]. Here we show for the first time that the PrP^C protein plays a fundamental role in the maintenance of the lung epithelial barrier. We propose to rank this protein among key actors that contribute in an orchestrated manner with the CFTR protein in the control of the lung barrier's integrity and to its susceptibility to infections in CF patients.

Acknowledgments

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

We acknowledge the following sources of funding: CNRS (LCBM-UMR 5249), INSERM (U1036), UJF, and CEA/DSV/BIG), ABCF2 and VLM (Vaincre la Mucoviscidose, France). JC is fellowship from VLM (Vaincre la mucoviscidose, France); AK, is a fellowship from AGIR program (University of Grenoble).

Author Disclosure Statement

There is no conflict of interest.

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.
- [2] Bobadilla JL, Macek Jr M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations—correlation with incidence data and application to screening. *Human Mutation*. 2002;19:575-606.
- [3] Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O, et al. An Animal Model for Cystic Fibrosis Made by Gene Targeting. *Science*. 1992;257:1083.
- [4] Konstan M, Berger M. Infection and inflammation in cystic fibrosis. *Cystic Fibrosis* PB Davis, ed Marcel Dekker, New York. 1993:219.
- [5] Di Sant'Agnese PA, Davis PB. Research in cystic fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 1976;295:597-602.
- [6] Pereira SH, Cervante MP, de Bentzmann S, Plotkowski MC. *Pseudomonas aeruginosa* entry into Caco-2 cells is enhanced in repairing wounded monolayers. *Microbial pathogenesis*. 1997;23:249-55.
- [7] Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, et al. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*. 2006;312:1526-30.
- [8] Rodríguez-Rojas A, Oliver A, Blázquez J. Intrinsic and environmental mutagenesis drive diversification and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung infections. *Journal of Infectious Diseases*. 2011;205:121-7.
- [9] Fleiszig S, Evans DJ, Do N, Vallas V, Shin S, Mostov KE. Epithelial cell polarity affects susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity. *Infection and immunity*. 1997;65:2861-7.
- [10] Coyne CB, Vanhook MK, Gambling TM, Carson JL, Boucher RC, Johnson LG. Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol Biol Cell*. 2002;13:3218-34.
- [11] Ramphal R, McNiece M, Polack F. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to the injured cornea: a step in the pathogenesis of corneal infections. *Annals of ophthalmology*. 1981;13:421-5.
- [12] Sheth H, Lee K, Wong W, Srivastava G, Hindsgaul O, Hodges R, et al. The pili of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAK and PAO bind specifically to the carbohydrate

sequence β GalNAc (1–4) β Gal found in glycosphingolipids asialo-GM1 and asialo-GM2. *Molecular microbiology*. 1994;11:715-23.

[13] Lee A, Chow D, Haus B, Tseng W, Evans D, Fleiszig S, et al. Airway epithelial tight junctions and binding and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1999;277:L204-L17.

[14] Kouadri A, El Khatib M, Cormenier J, Chauvet S, Zeinyeh W, El Khoury M, et al. Involvement of the Prion Protein in the Protection of the Human Bronchial Epithelial Barrier Against Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2018.

[15] Cormenier J, El Khatib M, Kouadri A, Macari L, Michaud-Soret I, Camara B, et al. Cellular prion protein (PrPC) is up regulated in cystic fibrosis: Role of CFTR protein. Submitted manuscript in *J of cell science*. 2019.

[16] Sontag EM, Samant RS, Frydman J. Mechanisms and Functions of Spatial Protein Quality Control. *Annual Review of Biochemistry*. 2017;86:97-122.

[17] Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp H-P, DeArmond SJ, et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*. 1992;356:577-82.

[18] Clarke LL, Grubb BR, Gabriel SE, Smithies O, Koller BH, Boucher RC. Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science*. 1992;257:1125-8.

[19] Cozens AL, Yezzi MJ, Kunzelmann K, Ohri T, Chin L, Eng K, et al. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1994;10:38-47.

[20] Plotkowski MC, Bentzmann Sd, Pereira SHM, Zahm J-M, Bajolet-Laudinat O, Roger P, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Internalization by Human Epithelial Respiratory Cells Depends on Cell Differentiation, Polarity, and Junctional Complex Integrity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1999;20:880-90.

[21] LeSimple P, Liao J, Robert R, Gruenert DC, Hanrahan JW. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking modulates the barrier function of airway epithelial cell monolayers. *J Physiol*. 2010;588:1195-209.

[22] Elsen S, Huber P, Bouillot S, Couté Y, Fournier P, Dubois Y, et al. A Type III Secretion Negative Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Employs a Two-Partner Secreted Exolysin to Induce Hemorrhagic Pneumonia. *Cell Host & Microbe*. 2014;15:164-76.

- [23] Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*. 1997;390:684.
- [24] Xu J, Church SJ, Patassini S, Begley P, Waldvogel HJ, Curtis MA, et al. Evidence for widespread, severe brain copper deficiency in Alzheimer's dementia. *Metallomics*. 2017;9:1106-19.
- [25] Bouillot S, Munro P, Gallet B, Reboud E, Cretin F, Golovkine G, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Exolysin promotes bacterial growth in lungs, alveolar damage and bacterial dissemination. *Sci Rep*. 2017;7:2120.
- [26] Llorens F, Ferrer I, del Rio JA. Gene expression resulting from PrPC ablation and PrPC overexpression in murine and cellular models. *Mol Neurobiol*. 2014;49:413-23.
- [27] Lavelle GM, White MM, Browne N, McElvaney NG, Reeves EP. Animal Models of Cystic Fibrosis Pathology: Phenotypic Parallels and Divergences. *Biomed Res Int*. 2016;2016:5258727.
- [28] Jackson A, Southern PM, Pierce AK, Fallis BD, Sanford JP. Pulmonary clearance of gram-negative bacilli. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1967;69:833-41.
- [29] Southern PM, Mays BB, Pierce AK, Sanford JP. Pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1970;76:548-59.
- [30] Scholte BJ, Davidson DJ, Wilke M, De Jonge HR. Animal models of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2004;3 Suppl 2:183-90.
- [31] Eliane Boudinot PT, Jean Champagnat, Arthur S. Foutz. Respiratory function in mice lacking or overexpressing the prion protein. *Neuroscience Letters*. 2002;323:89-92.
- [32] Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, et al. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature*. 1996;380:528-31.
- [33] Curcio L, Sebastiani C, Di Lorenzo P, Lasagna E, Biagetti M. Review: A review on classical and atypical scrapie in caprine: Prion protein gene polymorphisms and their role in the disease. *animal*. 2016;10:1585-93.
- [34] Pier GB, Grout M, Zaidi TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, et al. Role of Mutant CFTR in Hypersusceptibility of Cystic Fibrosis Patients to Lung Infections. *Science*. 1996;271:64.
- [35] Pier GB, Grout M, Zaidi TS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94:12088-93.

- [36] Ko YH, Delannoy M, Pedersen PL. Cystic fibrosis, lung infections, and a human tracheal antimicrobial peptide (hTAP). *FEBS Letters*. 1997;405:200-8.
- [37] Sagel SD, Gibson RL, Emerson J, McNamara S, Burns JL, Wagener JS, et al. Impact of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* infection on inflammation and clinical status in young children with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2009;154:183-8.
- [38] Darrah RJ, Mitchell AL, Campanaro CK, Barbato ES, Litman P, Sattar A, et al. Early pulmonary disease manifestations in cystic fibrosis mice. *J Cyst Fibros*. 2016;15:736-44.
- [39] Chmiel JF, Konstan MW, Knesebeck JE, Hilliard JB, Bonfield TL, Dawson DV, et al. IL-10 attenuates excessive inflammation in chronic *Pseudomonas* infection in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;160:2040-7.
- [40] Liu L, Jiang D, McDonald A, Hao Y, Millhauser GL, Zhou F. Copper redox cycling in the prion protein depends critically on binding mode. *Journal of the American Chemical Society*. 2011;133:12229-37.

Figure legends

Figure 1: *Pseudomonas aeruginosa* (P.A) transmigration and PrP^C expression.

(A) Cells were seeded at confluence (day 0) on polycarbonate filters and the TER was measured at day 10 of culture. (B) Determination of *Pseudomonas aeruginosa* (P.A) invasion on epithelial cells monolayer. Cells were cultured on 0.4 μm pore polycarbonate membrane and were infected with 10 MOI (Multiplicity Of Infection) of P.A constitutively expressing GFP. The nuclei were visualized by Hoechst staining. (C) Quantification of P.A invasion. The level of bacterial invasion was determined by counting the number of bacteria present within the cells. This value corresponds to the ratio "number of bacteria / number of nuclei" and normalized to the P.A number found in the control HBE cells. (D) Immunoblot detection of PrP^C protein after acute exposure to PAO1F. Cells were treated with P.A in a dose dependent manner (0 to 10 MOI of P.A) for 24 hours. Protein extracts were separated on 10% SDS-PAGE, transferred into nitrocellulose membrane, probed with mAb anti-PrP, SAF32 (Bertin-Pharma, France) and visualized by ECL. The black, gray and white arrows indicate the highly (H), intermediate (I), and unglycosylated (U) forms, respectively. (E) Immunoblot detection of PrP^C and CFTR proteins after acute infection with PAO1F. Mice were infected with 5.10^6 bacteria/mL for 24 hours and lung protein extracts were subjected to immunoblots using mAb anti-PrP (SAF32) and anti-CFTR 24.1 (R&D system). The black arrow indicates the fully glycosylated mature CFTR form (band C).

Figure 2: PrP^C, CFTR and junctional proteins expression in the wt, PrP^{-/-} and CFTR^{-/-} mice.

(A) and (B) RT-qPCR analyses of PrP^C and CFTR mRNAs in wt and PrP^{-/-} mice lungs. The levels of expression of PrP^C and CFTR mRNAs were quantified using RT-qPCR and normalized to the 18S mRNA and the to the actin levels. A.U : arbitrary unit. The results were presented according to the gender of the mouse. (C) Immunoblot detection of PrP^C and CFTR protein in lung protein extracts from wt and PrP^{-/-} mice. For PrP^C protein, the black, gray and white arrows indicates the highly (H), intermediate (I), and unglycosylated (U) forms, respectively. For the CFTR protein, the black arrow indicates the fully glycosylated mature CFTR form (band C) and the gray arrow indicates the core-glycosylated CFTR (band B). (D) ImageJ quantification of the CFTR complex glycosylated form. The results were standardized to β -actin expression. The results are expressed as a percentage of the levels quantified in the wt-mouse. (E) Immunoblot detection of CFTR, PrP^C, ZO1, Occludin (Occ), E-cadherin (E-cad), β -catenin (β -cat), Plakoglobin (Plak) and

Desmoplakin (Desp) in the protein extracted from the lung of the indicated mouse models, at the steady state or after the P.A acute infection. The levels of the protein expression were standardized to the β -actin expression.

Figure 3: PrP^C and CFTR protein expression in the mouse bronchial tissues.

(A) and (B) Immunolocalization of PrP^C and CFTR proteins using mAb anti-PrP (SAF32, Bertin-Pharma) or anti-CFTR (M3A7, Santa Cruz) antibodies, respectively, at the steady state (A) and after *Pseudomonas aeruginosa* acute infection (B) in wt, PrP^{-/-} and CFTR^{-/-} mouse bronchial tissues. Slides were counterstained using hematoxylin (Sigma Aldrich) and were examined under 40x objective. Br: Bronchiole, Al: Alveoli, Bv: Blood vessels. Scale bar=10 μ m.

Figure 4: Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* (P.A) dissemination in the mouse models.

(A) Comparison of the mice weight before and after the acute infection with P.A (24h). (B) Comparison of weights of the mice lungs after the P.A acute infection. (C) Comparison of the P.A dissemination towards the spleens in the three mouse models after 24h of P.A acute infection. The CFU were determined by plating of serial dilutions and colony counting in the spleen of the three mouse models. The results were normalized to the body weight of the mice (g).

Figure 5: Histological analyses of the lungs of the three mouse models upon the P.A acute infection.

(A) Reports photographs of lung sections of the three mouse models that were infected or not by P.A for 24h. Lung sections were stained with hematoxylin and eosin. The PMNs and macrophages were visualized with 40x magnification. Scale bar=10 μ m. (B) Quantification of PMNs and macrophages in lung tissue after 24h of the P.A infection. Cells were counted in ten fields per slide to generate a mean value. For each condition, at least three different sections collected from three different mouse were used. The mean values were compared to wt-mice. Br: Bronchiole, Al: Alveoli, Bv: Blood vessels, IF: inflammatory cells

Figure 6: Impact of P.A acute infection on the circulating cytokines in wt, PrP^{-/-} and CFTR^{-/-} mice.

A, B, C and D graphs report comparisons of the circulating levels of IL-6, IL-1 β , TNF- α and IL-10, respectively in wt, PrP^{-/-} and CFTR^{-/-} mice sera. The levels of the cytokines were assessed using the quantitative sandwich enzyme-linked immunoassay (ELISA) at the

steady state or after the P.A acute infection. The results were normalized to the body weight of the mice (g) and compared to basal conditions.

Figure 7: Measurement of the metal concentrations in the lung of the three mouse models in the absence or presence of the P.A acute infection.

ICP-MS determination of Cu (A), Fe (B), Mn (C) and Zn (D) contents in the lungs collected from the indicated mouse models under basal conditions and following the P.A acute infection. Lungs were dried and mineralized before the analysis. The results are expressed as μg of metal per total mass of the dry organ and were normalized to the body weight of the mice (g).

Figure 8: Measurement of the metal concentrations in the liver of the three mouse models in the absence or presence of the P.A acute infection.

ICP-MS determination of Cu (A), Fe (B), Mn (C) and Zn (D) contents in the livers collected from the indicated mouse models under basal conditions and following the P.A acute infection. Livers were dried and mineralized before the analysis. The results are expressed as μg of metal per total mass of the dry organ and were normalized to the body weight of the mice (g).

Figure 1

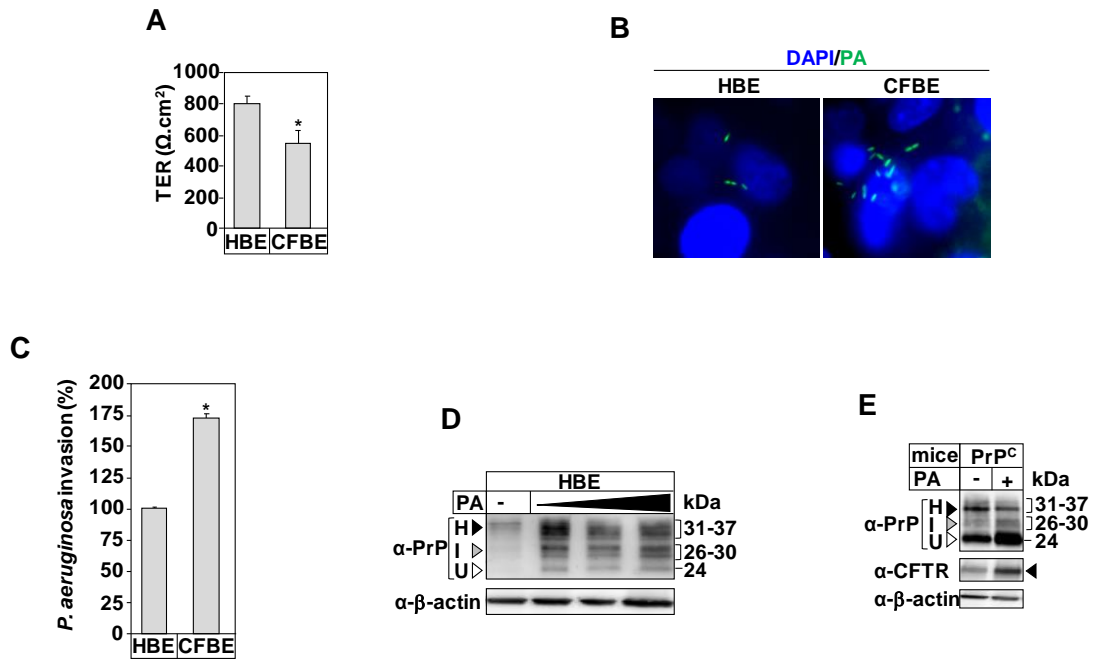


Figure 2

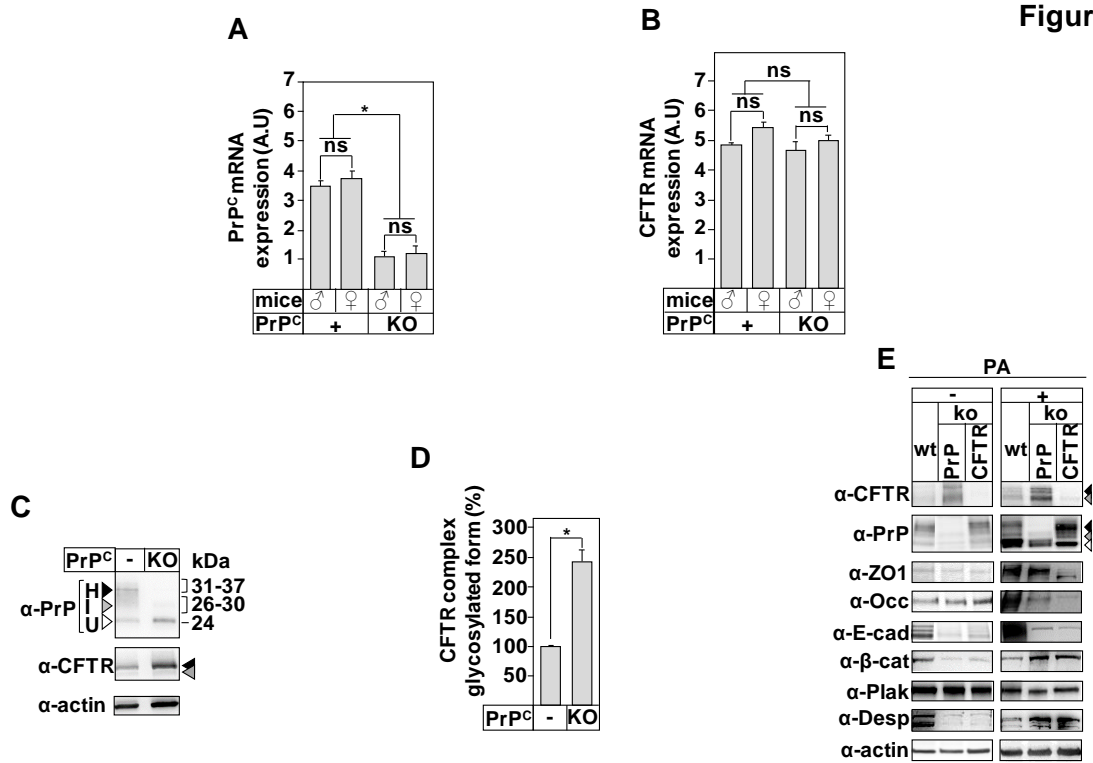


Figure 3

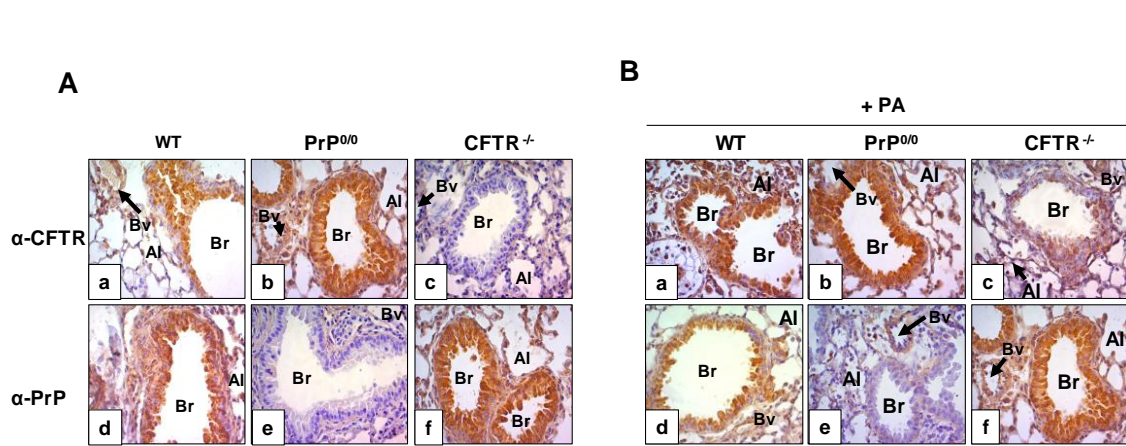


Figure 4

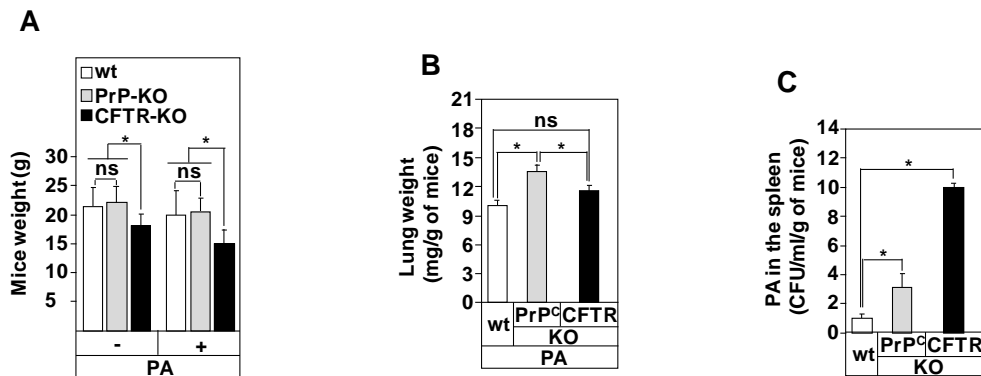


Figure 5

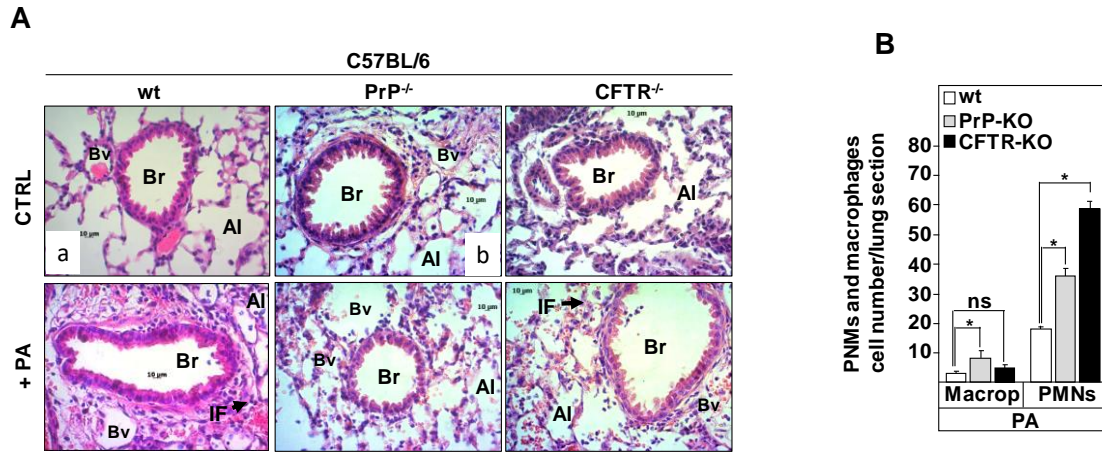


Figure 6

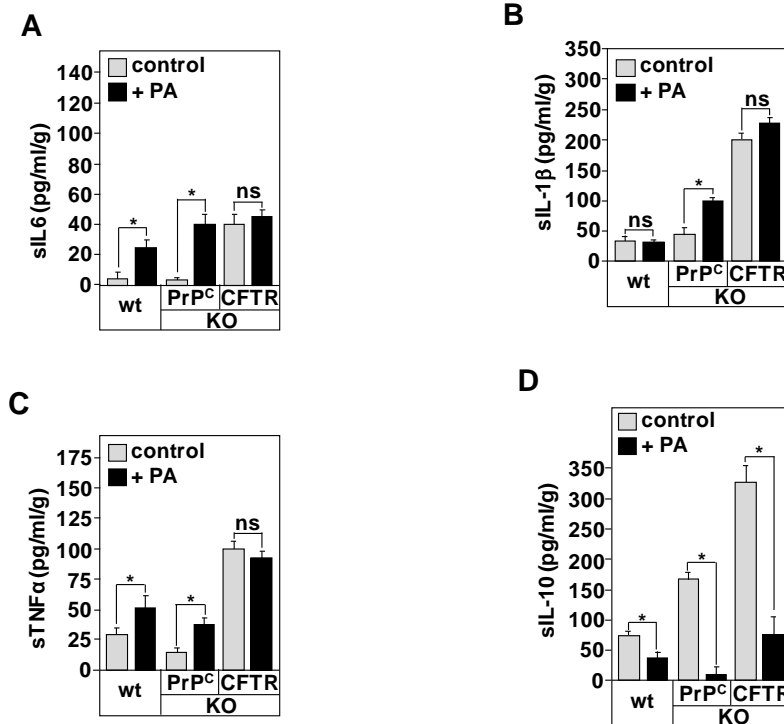


Figure 7

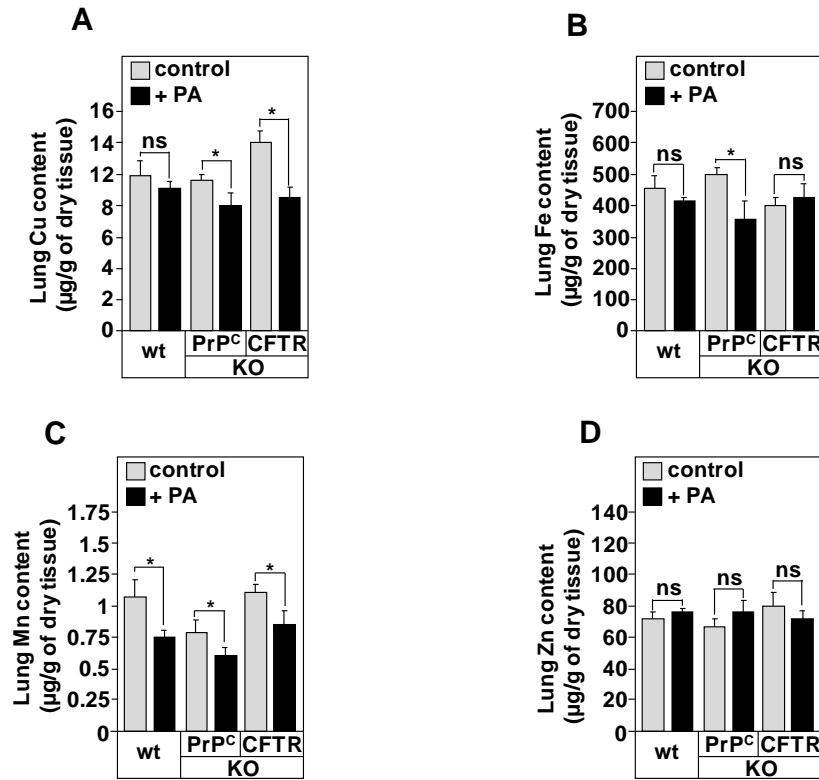
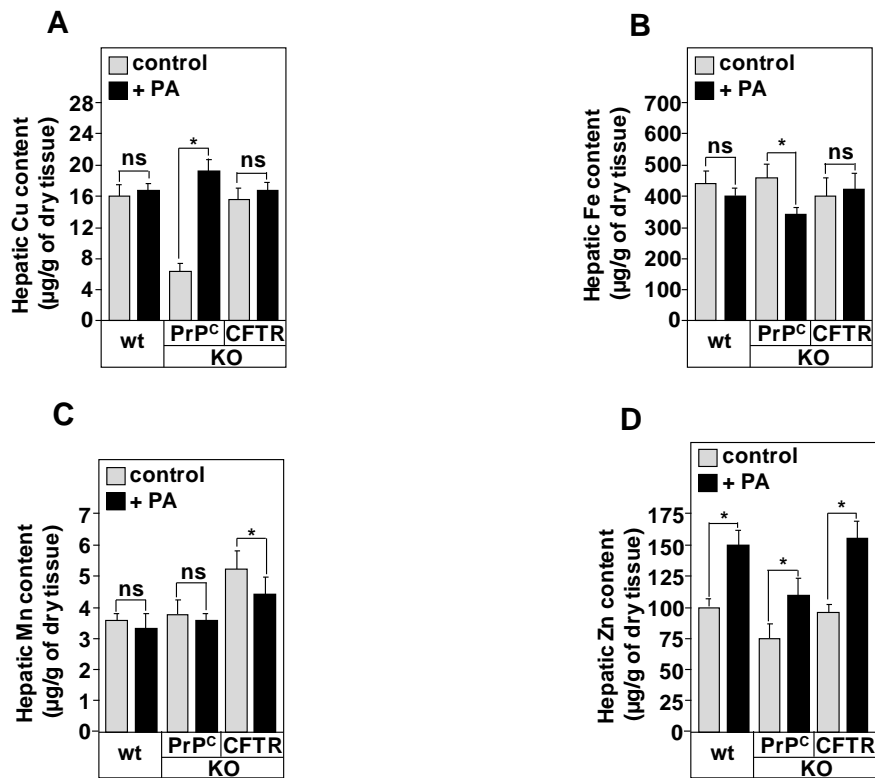


Figure 8



Conclusions générales

Conclusions générales

Que savons-nous sur l'adressage intracellulaire du CFTR et PrP^C ?

Au début du processus de polarisation des cellules épithéliales intestinales et bronchiques humaines, la protéine PrP^C présente une localisation apicale et latérale et la protéine CFTR est faiblement exprimée au niveau de la membrane basolatérale. A la fin de ce processus, PrP^C devient complètement latérale et la protéine CFTR est exprimée exclusivement au niveau de la membrane apicale ; c'est le processus de transcytose.

Dans la continuité de ce constat, nos travaux in vitro (cellules humaines bronchiques) et in vivo (modèles de souris invalidées pour les gènes Cfr ou Prnp) ont démontré que dans la maladie de la mucoviscidose :

- L'expression de PrP^C est augmentée au niveau ARNm et au niveau protéique.
- La forme hyperglycosylée (forme H) de PrP^C est augmentée au niveau de la membrane apicale et latérale. Cette augmentation n'est pas associée à l'activité canal chlorure du CFTR.
- L'expression élevée de PrP^C est due à la diminution de sa dégradation, associée probablement à un défaut d'endocytose.
- L'accumulation du PrP^C au niveau de la membrane apicale est associée à la rétention de CFTR-dF508 au niveau du réticulum endoplasmique (RE).
- La surexpression de la protéine CFTR-wt corrige le défaut d'adressage de la protéine PrP^C sans modifier sa demi-vie.
- Les protéines CFTR et PrP^C n'interagissent pas, mais colocalisent au niveau du RE et de la membrane. Cette colocalisation est dépendante du degré de polarisation des cellules épithéliales.
- L'absence d'une transcytose normale de PrP^C n'influence pas sa capacité à interagir avec les protéines des jonctions adhérentes et desmosomes, mais affecte leur stabilité et leur niveau d'expression, ainsi que leur profil de colocalisation.
- Le niveau d'expression des protéines des jonctions adhérentes et desmosomes n'est pas corrigé par la surexpression de CFTR-wt.
- La diminution de l'expression des protéines des jonctions adhérentes et desmosomes est responsable de la perte d'étanchéité de la barrière épithéliale bronchique (BEB).

→ La diminution de l'étanchéité de la BEB participe à la transmigration et à la dissémination de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau pulmonaire, qui a pour conséquence l'exacerbation de la réponse inflammatoire et la dérégulation de l'homéostasie des métaux essentiels comme le fer, le zinc, le manganèse et le cuivre.

Pour résumer, la protéine CFTR participe à la transcytose de PrP^C de la membrane apicale vers la membrane latérale, au niveau de laquelle PrP^C interagit, stabilise et protège les protéines des jonctions adhérentes et desmosomes contre le stress oxydatif d'origine métallique. Dans la mucoviscidose, la protéine CFTR-dF508 étant bloquée au niveau du RE, la protéine PrP^C adressée dans un premier temps vers la membrane apicale ne peut plus subir une transcytose normale et reste par conséquent séquestrée au niveau de la membrane apicale. Ce phénomène déstabilise les protéines des jonctions et affaiblit la barrière épithéliale bronchique, la rendant franchissable par *Pseudomonas aeruginosa*.

Les schémas suivants (Figure 27 et 28) illustrent le mécanisme que nous proposons et pour lequel plusieurs points restent à élucider.

Conclusions générales

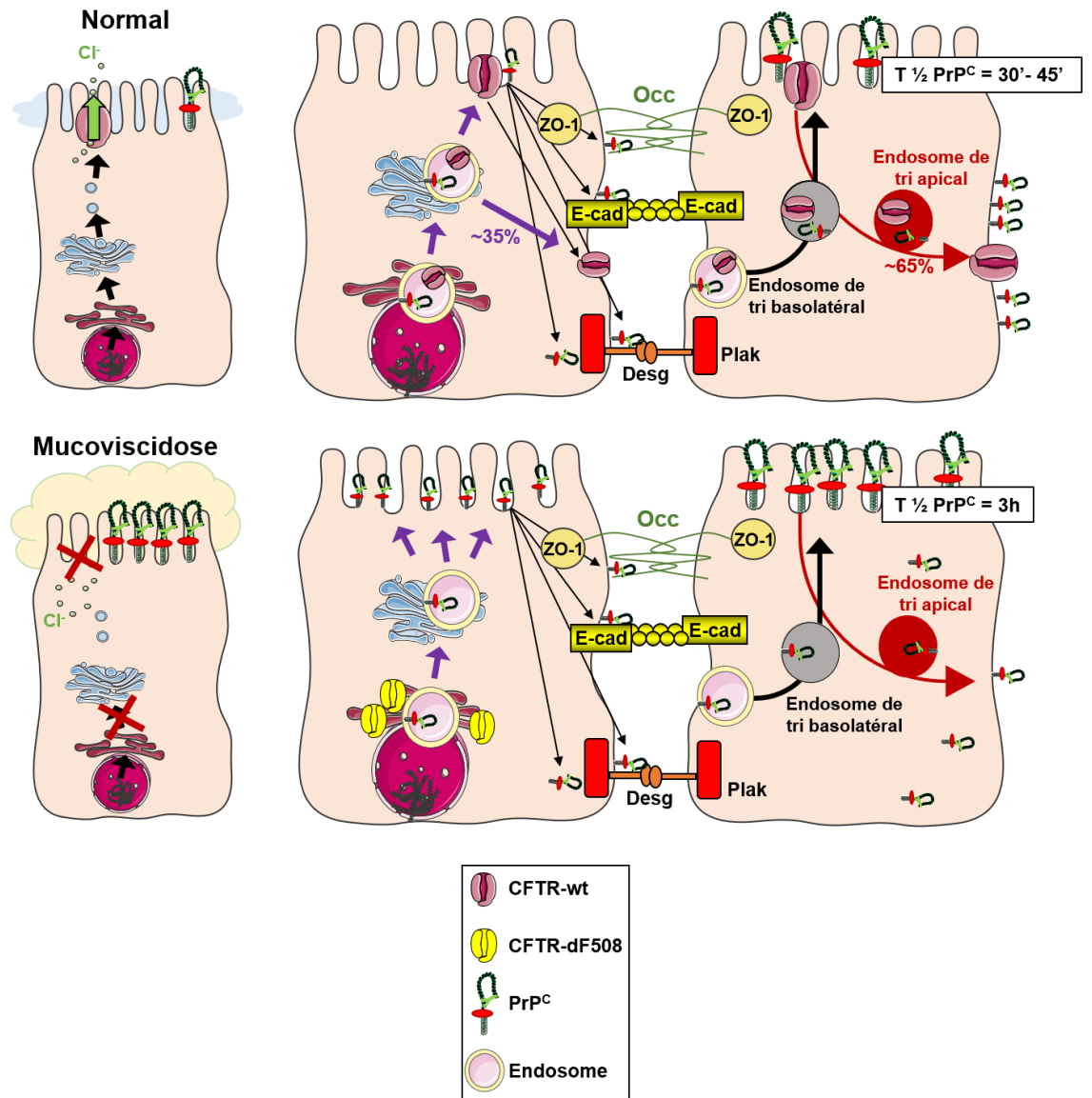


Figure 27 : Schéma récapitulatif du rôle cellulaire de la protéine PrP^C dans la mucoviscidose.

Conclusions générales

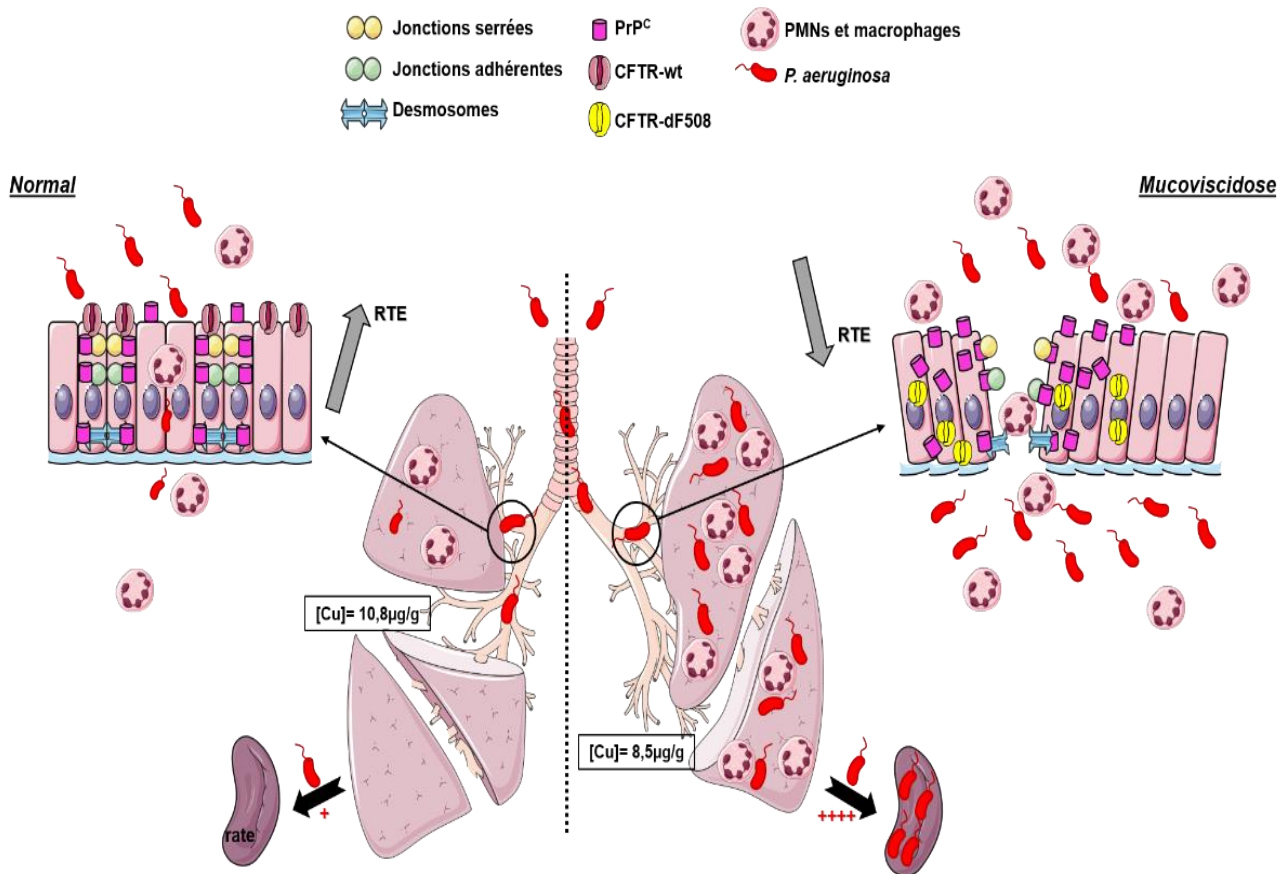


Figure 28 : Schéma récapitulatif illustrant les conséquences pulmonaires de la dérégulation de PrP^C dans la mucoviscidose

Perspectives de thèse

Perspectives de thèse

Dans mon projet de thèse, nous avons répondu à plusieurs interrogations au sujet de l'implication de la protéine PrP^C dans le contrôle de la barrière épithéliale bronchique. Néanmoins, il reste encore de nombreuses questions quant aux mécanismes moléculaires responsables des phénomènes cellulaires précédemment mis en lumière. Ainsi, mon projet ouvre de multiples perspectives:

☞ Vérifier par séquençage du gène *PRNP* (promoteur, exon et intron) si des mutations sont présentes et seraient associées à la maladie de la mucoviscidose.

☞ Confirmer la présence d'un défaut d'endocytose du PrP^C dans les CFBE par rapport aux cellules HBE en mesurant la vitesse d'endocytose et de recyclage.

☞ PrP^C est exprimée dans de nombreux tissus, il serait intéressant de déterminer, par étude transcriptomique (en définissant un seuil de détection optimal), si l'augmentation de l'expression de PrP^C dans le contexte CF est spécifique du poumon ou si elle se retrouve également dans d'autres organes particulièrement affectés par la maladie tels que les intestins, le pancréas ou l'appareil reproducteur. Par ailleurs, notre groupe envisage de cartographier l'expression de PrP^C dans les différentes zones du poumon afin de préciser sa localisation.

☞ Les mécanismes de régulations positives de PrP^C dans la mucoviscidose sont encore inconnus, néanmoins et étant donné que PrP^C joue un rôle dans la régulation de l'inflammation, il est probable que cette régulation soit médiée par une voie de signalisation pro-inflammatoire telle que les voies NFκB, MAPK ou JAK-STAT. Nous avons récemment initié cette étude et observé une augmentation de l'expression de PrP^C suite à un traitement au TNF-α, activateur de la voie NFκB. De plus, nous avons identifié la séquence originale de fixation de NFκB (ATTTGCAT) sur le promoteur du gène *PRNP* ainsi que le motif de fixation des sous-unités p50-p65 de NFκB (GAGACC), suggérant que l'augmentation de l'expression de PrP^C pourrait être médiée par une régulation transcriptionnelle via la voie NFκB. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait pertinent de cloner le promoteur du gène *PRNP* dans un système d'expression en association avec la luciférase. D'une part, nous pourrions identifier les différentes séquences de

fixation des métaux et déterminer celles qui activent la transcription du gène *PRNP*, d'autre part nous pourrions muter certains sites potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression de PrP^C et caractériser leur rôle dans le contrôle de processus en lien avec la perméabilité de la cellule bronchique.

☞ Au vu de son implication dans l'inflammation, dans la transmigration des PMNs et de son expression élevée au niveau des cellules endothéliales, il serait très intéressant de déterminer si PrP^C joue un rôle le contrôle de la barrière endothéliale et dans la transmigration des cellules de l'inflammation au travers l'endothélium. Pour répondre à cette question, il serait intéressant de développer un modèle de co-culture de cellules épithéliales et endothéliales bronchiques afin d'y examiner l'expression de PrP^C et l'effet de son invalidation sur la transmigration endothéliale des neutrophiles. Ce lien étroit entre PrP^C, l'inflammation et le recrutement massif de PMNs laisse penser que PrP^C pourrait directement contrôler la libération et/ou l'activation des neutrophiles. Ainsi, il serait pertinent de réaliser des tests d'activation de PMNs en présence de la protéine PrP^C, tronquée ou mutée. En effet, il a été démontré que la partie N-terminale de PrP^C peut être clivée et libérée dans le milieu extracellulaire. Cependant, une fonction de ligand ou de messenger de l'extrémité N-term de PrP^C n'a jamais été décrite. Cette notion de messenger cellulaire représenterait également un enjeu dans la compréhension des fonctions physiologiques de PrP^C.

☞ Nos conclusions au sujet de l'existence d'un phénomène de transcytose commun aux protéines PrP^C et CFTR suggèrent l'existence de processus communs dans la régulation du trafic intracellulaire de PrP^C et celui de CFTR et ouvrent des perspectives intéressantes à entreprendre. Pour confirmer ces hypothèses nous envisageons d'étudier les différentes voies de transcytose ou encore tracer par immunofluorescence le trafic intracellulaire de PrP^C en absence ou en présence de la protéine CFTR. En effet, en fonction du tissu et de l'environnement cellulaire considéré, les voies de transcytoses incluant les protéines vésiculaires de la famille Rab varient significativement. Il a été récemment décrit que la phosphorylation de la cavéoline-1 induite par le peroxyde d'hydrogène est cruciale pour l'activation de la transcytose dans le tissu vasculaire pulmonaire. Ainsi, nous pensons que la régulation de la transcytose de PrP^C et CFTR est soumise à la phosphorylation

Perspectives de thèse

préalable de certains récepteurs. Pour répondre à cette question, nous pourrions dans un premier temps isoler les domaines cellulaires rafts (domaines radeaux lipidiques) ou cavéolés (contenant des invaginations membranaires constituées de cavéoles) afin de déterminer si les protéines PrP^C et CFTR y coexistent. Aussi, nous pourrions réaliser un fractionnement subcellulaire afin d'isoler les vésicules de la membrane plasmique, de l'appareil de Golgi et du RE et identifier les compartiments cellulaires dans lesquelles PrP^C et CFTR sont retrouvées conjointement.

☞ Les expérimentations réalisées *in vitro* dans mon projet de thèse sur les cellules HBE et HBE-PrP^C devront également être réalisées sur une lignée cellulaire isogénique pour la lignée parental HBE et invalidée pour PrP^C (HBE-PrP-KO). Cette étude nous permettra de confirmer l'implication directe de PrP^C dans le contrôle de la perméabilité de la cellule bronchique normale et mucoviscidose. Nous avons tout récemment généré cette lignée cellulaire au laboratoire par la technique du CRISPR-Cas9 et nous sommes en cours d'investigation de l'impact cellulaire de l'extinction de PrP^C sur les mêmes processus étudiés dans le contexte de sa surexpression entrepris dans mon projet de thèse. Dans le même sens, notre étude *in vitro* devra être complétée par des expérimentations sur le modèle murin surexprimant la protéine PrP^C (souris tga20).

☞ Pour finir, l'étude par cryo-microscopie électronique de l'état de la barrière épithéliale jonctionnelle dans des modèles surexprimants ou invalidés pour PrP^C serait un bon indicateur de l'intégrité de la barrière bronchique. En effet, cette technique permettrait d'évaluer quantitativement l'impact de PrP^C sur la perte de l'étanchéité de la barrière et la formation de brèche en mesurant l'espace paracellulaire entre deux cellules épithéliales. Par ailleurs, cette mesure pourrait apporter la preuve que la taille d'une brèche dans la barrière épithéliale bronchique serait suffisamment importante pour permettre le passage paracellulaire de *Pseudomonas aeruginosa*, un sujet qui reste très débattu.

Bibliographie

Bibliographie

1. Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C. Das Coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasien. *Wien Med Wochenschr.* 1936;86:753-6.
2. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. *American journal of Diseases of Children.* 1938;56(2):344-99.
3. Farber S. Pancreatic insufficiency and the celiac syndrome. *New England Journal of Medicine.* 1943;229:653-87.
4. Andersen DH, Hodges RG. Celiac syndrome: V. genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology. *American journal of diseases of children.* 1946;72(1):62-80.
5. Di S, Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in Cystic Fibrosis of the pancreas. *Pediatrics.* 1953;12(5):549.
6. Knowles M, Gatzky J, Boucher R. Increased Bioelectric Potential Difference across Respiratory Epithelia in Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine.* 1981;305(25):1489-95.
7. Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature.* 1983;301(5899):421-2.
8. 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(4922):1066.
9. Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, et al. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature.* 1990;347(6291):358-63.
10. Bear CE, Li C, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, et al. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell.* 1992;68(4):809-18.
11. Bobadilla JL, Macek Jr M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations—correlation with incidence data and application to screening. *Human Mutation.* 2002;19(6):575-606.
12. Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic Fibrosis: A Review of Epidemiology and Pathobiology. *Clinics in Chest Medicine.* 2007;28(2):279-88.
13. Bellis GD, C. Lemonnier, L. Registre français de la Mucoviscidose - Bilan des données 2016. 2017.
14. Ravilly S, Le Roux E, Bellis G, Dufour F. Épidémiologie et physiopathologie de la mucoviscidose. *Revue Francophone des Laboratoires.* 2007;2007(397):25-36.
15. Dodge JA, Lewis PA, Stanton M, Wilsher J. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947–2003. *European Respiratory Journal.* 2007;29(3):522.
16. Gosalia N, Harris A. Chromatin Dynamics in the Regulation of CFTR Expression. *Genes.* 2015;6(3).
17. Trezise AEO, Chambers JA, Wardle CJ, Gould S, Harris A. Expression of the cystic fibrosis gene in human foetal tissues. *Human Molecular Genetics.* 1993;2(3):213-8.
18. Engelhardt JF, Zepeda M, Cohn JA, Yankaskas JR, Wilson JM. Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *The Journal of Clinical Investigation.* 1994;93(2):737-49.
19. Liu F, Zhang Z, Csanády L, Gadsby DC, Chen J. Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel. *Cell.* 2017;169(1):85-95.e8.
20. Engelhardt JF, Yankaskas JR, Ernst SA, Yang Y, Marino CR, Boucher RC, et al. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nature Genetics.* 1992;2(3):240-8.

Bibliographie

21. Cozens AL, Yezzi MJ, Kunzelmann K, Ohri T, Chin L, Eng K, et al. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1994;10(1):38-47.
22. Trezise AEO, Buchwald M. In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature*. 1991;353(6343):434-7.
23. Patrizio P, Salameh W. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mRNA in normal and pathological adult human epididymis. *Journal of reproduction and fertility Supplement*. 1998;53:261-70.
24. Zeng W, Lee MG, Yan M, Diaz J, Benjamin I, Marino CR, et al. Immuno and functional characterization of CFTR in submandibular and pancreatic acinar and duct cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1997;273(2):C442-C55.
25. Guo Y, Su M, McNutt MA, Gu J. Expression and Distribution of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Neurons of the Human Brain. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2009;57(12):1113-20.
26. Gadsby DC, Vergani P, Csanády L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*. 2006;440(7083):477-83.
27. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal*. 1982;1(8):945-51.
28. Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*. 1991;66(5):1027-36.
29. Lu Y, Xiong X, Helm A, Kimani K, Bragin A, Skach WR. Co- and Posttranslational Translocation Mechanisms Direct Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator N Terminus Transmembrane Assembly. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(1):568-76.
30. Skach WR. Defects in processing and trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Kidney International*. 2000;57(3):825-31.
31. Amaral MD. CFTR and chaperones. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2004;23(1):41-8.
32. Wang X, Venable J, LaPointe P, Hutt DM, Koulov AV, Coppinger J, et al. Hsp90 Cochaperone Aha1 Downregulation Rescues Misfolding of CFTR in Cystic Fibrosis. *Cell*. 2006;127(4):803-15.
33. Farinha CM, Nogueira P, Mendes F, Penque D, Amaral MD. The human DnaJ homologue (Hdj)-1/heat-shock protein (Hsp) 40 co-chaperone is required for the in vivo stabilization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by Hsp70. *Biochemical Journal*. 2002;366(3):797.
34. Geoffrey C, Meacham ZL, Scott King, Eric Sorscher, Albert Tousson, Douglas M. Cyr. The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *The EMBO Journal*. 1999;18(6):1492-505.
35. Kim S, Skach W. Mechanisms of CFTR Folding at the Endoplasmic Reticulum. *Frontiers in Pharmacology*. 2012;3:201.
36. Lukacs LG, Segal G, Kartner N, Grinstein S, Zhang F. Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein phosphorylation. *Biochemical Journal*. 1997;328(2):353.
37. Bradbury NA, Clark JA, Watkins SC, Widnell CC, Smith HS, Bridges RJ. Characterization of the internalization pathways for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1999;276(4):L659-L68.
38. Kowalski MP, Pier GB. Localization of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to Lipid Rafts of Epithelial Cells Is Required for Pseudomonas aeruginosa-Induced Cellular Activation. *The Journal of Immunology*. 2004;172(1):418.

Bibliographie

39. Pier GB, Grout M, Zaidi TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, et al. Role of Mutant CFTR in Hypersusceptibility of Cystic Fibrosis Patients to Lung Infections. *Science*. 1996;271(5245):64.
40. Short DB, Trotter KW, Reczek D, Kreda SM, Bretscher A, Boucher RC, et al. An Apical PDZ Protein Anchors the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to the Cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(31):19797-801.
41. Gabriel SE, Clarke LL, Boucher RC, Stutts MJ. CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature*. 1993;363(6426):263-6.
42. Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR Is a Conductance Regulator as well as a Chloride Channel. *Physiological Reviews*. 1999;79(1):S145-S66.
43. Loussouarn GD, S. Mohammad-Panah, R. Escande, D. Baro, I. Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K⁺ currents. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1996;271(5):C1565-C73.
44. Yoo D, Flagg TP, Olsen O, Raghuram V, Foskett JK, Welling PA. Assembly and Trafficking of a Multiprotein ROMK (Kir 1.1) Channel Complex by PDZ Interactions. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(8):6863-73.
45. McNicholas CMY, Y. Giebisch, G. and Hebert, S. C. Molecular site for nucleotide binding on an ATP-sensitive renal K⁺ channel (ROMK2). *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1996;271(2):F275-F85.
46. Kunzelmann K, Schreiber R, Boucherot A. Mechanisms of the inhibition of epithelial Na⁺ channels by CFTR and purinergic stimulation. *Kidney International*. 2001;60(2):455-61.
47. König J, Schreiber R, Mall M, Kunzelmann K. No evidence for inhibition of ENaC through CFTR-mediated release of ATP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2002;1565(1):17-28.
48. Kunzelmann K, Kiser G, Schreiber R, Riordan J. Inhibition of epithelial Na⁺ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS letters*. 1997;400(3):341-4.
49. Cantiello HF. Role of the actin cytoskeleton in the regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Experimental Physiology: Translation and Integration*. 1996;81(3):505-14.
50. Berdiev BK, Prat AG, Cantiello HF, Ausiello DA, Fuller CM, Jovov B, et al. Regulation of epithelial sodium channels by short actin filaments. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(30):17704-10.
51. Reddy M, Quinton P. Functional interaction of CFTR and ENaC in sweat glands. *Pflügers Archiv*. 2003;445(4):499-503.
52. Reddy M, Quinton P. Cytosolic potassium controls CFTR deactivation in human sweat duct. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2006;291(1):C122-C9.
53. Konstas A-A, Korbmacher C. The γ -subunit of ENaC is more important for channel surface expression than the β -subunit. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2003;284(2):C447-C56.
54. Hanukoglu I, Hanukoglu A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: phylogeny, structure–function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*. 2016;579(2):95-132.
55. Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, et al. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in α ENaC-deficient mice. *Nature genetics*. 1996;12(3):325.
56. Kerem E, Bistrizer T, Hanukoglu A, Hofmann T, Zhou Z, Bennett W, et al. Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in pseudohypoaldosteronism. *New England Journal of Medicine*. 1999;341(3):156-62.
57. Nur N, Lang C, Hodax JK, Quintos JB. Systemic pseudohypoaldosteronism type I: a case report and review of the literature. *Case reports in pediatrics*. 2017;2017.

Bibliographie

- 58.Caci E, Melani R, Pedemonte N, Yueksekdag G, Ravazzolo R, Rosenecker J, et al. Epithelial sodium channel inhibition in primary human bronchial epithelia by transfected siRNA. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2009;40(2):211-6.
- 59.Sobczak K, Segal A, Bangel-Ruland N, Semmler J, Van Driessche W, Lindemann H, et al. Specific inhibition of epithelial Na⁺ channels by antisense oligonucleotides for the treatment of Na⁺ hyperabsorption in cystic fibrosis. *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*. 2009;11(9):813-23.
- 60.Zhao C, Crosby J, Lv T, Bai D, Monia BP, Guo S. Antisense oligonucleotide targeting of mRNAs encoding ENaC subunits α , β , and γ improves cystic fibrosis-like disease in mice. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2019;18(3):334-41.
- 61.Kimura T, Kawabe H, Jiang C, Zhang W, Xiang Y-Y, Lu C, et al. Deletion of the ubiquitin ligase Nedd4L in lung epithelia causes cystic fibrosis-like disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(8):3216-21.
- 62.Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nature medicine*. 2004;10(5):487.
- 63.Seidler U, Blumenstein I, Kretz A, Viellard-Baron D, Rossmann H, Colledge W, et al. A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca²⁺-dependent HCO₃⁻ secretion. *The Journal of Physiology*. 1997;505(2):411-23.
- 64.Banales JM, Prieto J, Medina JF. Cholangiocyte anion exchange and biliary bicarbonate excretion. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2006;12(22):3496.
- 65.Burghardt B, Elkjaer M, Kwon T, Racz G, Varga G, Steward M, et al. Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas. *Gut*. 2003;52(7):1008-16.
- 66.Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*. 1993;75(3):409-18.
- 67.Naren AP, Quick MW, Collawn JF, Nelson DJ, Kirk KL. Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(18):10972-7.
- 68.Cormet-Boyaka E, Di A, Chang SY, Naren AP, Tousson A, Nelson DJ, et al. CFTR chloride channels are regulated by a SNAP-23/syntaxin 1A complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(19):12477-82.
- 69.Ganeshan R, Di A, Nelson DJ, Quick MW, Kirk KL. The interaction between syntaxin 1A and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels is mechanistically distinct from syntaxin 1A-SNARE interactions. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(5):2876-85.
- 70.Bilan F, Thoreau V, Nacfer M, Dérand R, Norez C, Cantereau A, et al. Syntaxin 8 impairs trafficking of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and inhibits its channel activity. *Journal of cell science*. 2004;117(10):1923-35.
- 71.Bilan F, Nacfer M, Fresquet F, Norez C, Melin P, Martin-Berge A, et al. Endosomal SNARE proteins regulate CFTR activity and trafficking in epithelial cells. *Experimental cell research*. 2008;314(11-12):2199-211.
- 72.Zhang H, Peters KW, Sun F, Marino CR, Lang J, Burgoyne RD, et al. Cysteine string protein interacts with and modulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(32):28948-58.
- 73.Gentzsch M, Chang X-B, Cui L, Wu Y, Ozols VV, Choudhury A, et al. Endocytic trafficking routes of wild type and $\Delta F508$ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Molecular biology of the cell*. 2004;15(6):2684-96.

Bibliographie

74. Ameen N, Silvis M, Bradbury NA. Endocytic trafficking of CFTR in health and disease. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2007;6(1):1-14.
75. Fu L, Sztul E. ER-associated complexes (ERACs) containing aggregated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) are degraded by autophagy. *European journal of cell biology*. 2009;88(4):215-26.
76. Sharma M, Pampinella F, Nemes C, Benharouga M, So J, Du K, et al. Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J Cell Biol*. 2004;164(6):923-33.
77. Varga K, Goldstein RF, Jurkuvenaite A, Chen L, Matalon S, Sorscher EJ, et al. Enhanced cell-surface stability of rescued $\Delta F508$ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by pharmacological chaperones. *Biochemical Journal*. 2008;410(3):555-64.
78. Stoops EH, Caplan MJ. Trafficking to the apical and basolateral membranes in polarized epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2014;25(7):1375-86.
79. Cholon DM, O'Neal WK, Randell SH, Riordan JR, Gentsch M. Modulation of endocytic trafficking and apical stability of CFTR in primary human airway epithelial cultures. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2009;298(3):L304-L14.
80. Swiatecka-Urban A, Talebian L, Kanno E, Moreau-Marquis S, Coutermarsh B, Hansen K, et al. Myosin Vb is required for trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in Rab11a-specific apical recycling endosomes in polarized human airway epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(32):23725-36.
81. Holleran JP, Zeng J, Frizzell RA, Watkins SC. Regulated recycling of mutant CFTR is partially restored by pharmacological treatment. *J Cell Sci*. 2013;126(12):2692-703.
82. Farmen SL, Karp PH, Ng P, Palmer DJ, Koehler DR, Hu J, et al. Gene transfer of CFTR to airway epithelia: low levels of expression are sufficient to correct Cl⁻ transport and overexpression can generate basolateral CFTR. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2005;289(6):L1123-L30.
83. Ballard ST, Trout L, Mehta A, Inglis SK. Liquid secretion inhibitors reduce mucociliary transport in glandular airways. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2002;283(2):L329-L35.
84. Bidaud-Meynard A, Bossard F, Schnúr A, Fukuda R, Veit G, Xu H, et al. Transcytosis maintains CFTR apical polarity in the face of constitutive and mutation-induced basolateral missorting. *Journal of Cell Science*. 2019;132(10):jcs226886.
85. Tirouvanziam R, de Bentzmann S, Hubeau C, Hinnrasky J, Jacquot J, Péault B, et al. Inflammation and Infection in Naive Human Cystic Fibrosis Airway Grafts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2000;23(2):121-7.
86. Verhaeghe C, Delbecq K, de Leval L, Oury C, Bours V. Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2007;6(4):304-8.
87. Nakamura H, Yoshimura K, McElvaney NG, Crystal RG. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *The Journal of Clinical Investigation*. 1992;89(5):1478-84.
88. Munir M, Zaman AG, Omer Junaidi, Meredith M, Regan, Michel Warny, Julie C. Shea, Ciaran Kelly, Brian P. O'Sullivan, Steven D. Freedman. Interleukin 8 Secretion from Monocytes of Subjects Heterozygous for the $\Delta F508$ Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Mutation Is Altered. *American Society for Microbiology*. 2004;11(5):819-24.
89. Bodas M, Vij N. The NF κ B signaling in cystic fibrosis lung disease: pathophysiology and therapeutic potential. *Discovery medicine*. 2010;9(47):346.
90. Torsten H. Schroeder MML, Patrick W. Yacono, Carolyn L. Cannon, A. Alev Gerçeker, David E. Golan, and Gerald B. Pier. CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas*

Bibliographie

aeruginosa LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF- κ B translocation. PNAS. 2002;99(10):6907–12.

91.Vij N, Mazur S, Zeitlin PL. CFTR Is a Negative Regulator of NF κ B Mediated Innate Immune Response. PLOS ONE. 2009;4(2):e4664.

92.Coraux C, Kileztky C, Polette M, Hinnrasky J, Zahm J-M, Devillier P, et al. Airway Epithelial Integrity Is Protected by a Long-Acting β 2-Adrenergic Receptor Agonist. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2004;30(5):605-12.

93.Rejman J DGS, Bragonzi A, and Conese M. Pseudomonas aeruginosa Infection Destroys the Barrier Function of Lung Epithelium and Enhances Polyplex-Mediated Transfection. Human Gene Therapy. 2007;18(7):642-52.

94.Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, et al. Adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. Nature Reviews Microbiology. 2012;10(12):841-51.

95.Ruffin M, Bilodeau C, Maillé É, LaFayette SL, McKay GA, Trinh NTN, et al. Quorum-sensing inhibition abrogates the deleterious impact of Pseudomonas aeruginosa on airway epithelial repair. The FASEB Journal. 2016;30(9):3011-25.

96.Swiatecka-Urban A, Moreau-Marquis S, MacEachran DP, Connolly JP, Stanton CR, Su JR, et al. Pseudomonas aeruginosa inhibits endocytic recycling of CFTR in polarized human airway epithelial cells. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2006;290(3):C862-C72.

97.Rubino R, Bezzeri V, Favia M, Facchini M, Tebon M, Singh AK, et al. Pseudomonas aeruginosa reduces the expression of CFTR via post-translational modification of NHERF1. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. 2014;466(12):2269-78.

98.Trinh NTN, Bilodeau C, Maillé É, Ruffin M, Quintal M-C, Desrosiers M-Y, et al. Deleterious impact of Pseudomonas aeruginosa on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and rescue in airway epithelial cells. European Respiratory Journal. 2015;45(6):1590.

99.Saint-Criq V, Gray MA. Role of CFTR in epithelial physiology. Cellular and Molecular Life Sciences. 2017;74(1):93-115.

100.Bomberger JM, Ye S, MacEachran DP, Koeppen K, Barnaby RL, O'Toole GA, et al. A Pseudomonas aeruginosa Toxin that Hijacks the Host Ubiquitin Proteolytic System. PLOS Pathogens. 2011;7(3):e1001325.

101.LeSimple P, Liao J, Robert R, Gruenert DC, Hanrahan JW. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking modulates the barrier function of airway epithelial cell monolayers. J Physiol. 2010;588(Pt 8):1195-209.

102.Weiser N, Molenda N, Urbanova K, Bähler M, Pieper U, Oberleithner H, et al. Paracellular Permeability of Bronchial Epithelium is Controlled by CFTR. Cellular Physiology and Biochemistry. 2011;28(2):289-96.

103.Chanson M, Scerri I, Suter S. Defective regulation of gap junctional coupling in cystic fibrosis pancreatic duct cells. The Journal of Clinical Investigation. 1999;103(12):1677-84.

104.Dudez T, Borot F, Huang S, Kwak BR, Bacchetta M, Ollero M, et al. CFTR in a lipid raft-TNFR1 complex modulates gap junctional intercellular communication and IL-8 secretion. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2008;1783(5):779-88.

105.Chen Y-H, Lu Q, Goodenough DA, Jeansonne B. Nonreceptor Tyrosine Kinase c-Yes Interacts with Occludin during Tight Junction Formation in Canine Kidney Epithelial Cells. Molecular Biology of the Cell. 2002;13(4):1227-37.

106.Mohler PJ, Kreda SM, Boucher RC, Sudol M, Stutts MJ, Milgram SL. Yes-Associated Protein 65 Localizes P62c-Yes to the Apical Compartment of Airway Epithelia by Association with Ebp50. The Journal of Cell Biology. 1999;147(4):879.

Bibliographie

107. Wang S, Raab RW, Schatz PJ, Guggino WB, Li M. Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Letters*. 1998;427(1):103-8.
108. Zahraoui A. Les jonctions serrées : Plate-forme de régulation de la prolifération et de la polarité cellulaires. *Med Sci (Paris)*. 2004;20(5):580-5.
109. Basuroy S, Sheth P, Kuppuswamy D, Balasubramanian S, Ray RM, Rao RK. Expression of Kinase-inactive c-Src Delays Oxidative Stress-induced Disassembly and Accelerates Calcium-mediated Reassembly of Tight Junctions in the Caco-2 Cell Monolayer. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(14):11916-24.
110. Voltz JW, Weinman EJ, Shenolikar S. Expanding the role of NHERF, a PDZ-domain containing protein adapter, to growth regulation. *Oncogene*. 2001;20(44):6309-14.
111. Wang Y, Du D, Fang L, Yang G, Zhang C, Zeng R, et al. Tyrosine phosphorylated Par3 regulates epithelial tight junction assembly promoted by EGFR signaling. *The EMBO Journal*. 2006;25(21):5058-70.
112. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*. 1993;73(7):1251-4.
113. Fanen P, Wohlhuter-Haddad A, Hinzpeter A. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014;52:94-102.
114. Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL, Riordan JR. Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell*. 1995;83(1):129-35.
115. Ward CL, Omura S, Kopito RR. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*. 1995;83(1):121-7.
116. De Keukeleire B, Micoud J, Biard J, Benharouga M. Endoplasmic reticulum-associated degradation of mutant CFTR requires a guanine nucleotide-sensitive step. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008;40(9):1729-42.
117. Lukacs GL, Chang XB, Bear C, Kartner N, Mohamed A, Riordan JR, et al. The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(29):21592-8.
118. Anderson MP, Welsh MJ. Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains. *Science*. 1992;257(5077):1701.
119. Foundation Cf. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry, 2017 Annual Data Report, Bethesda, Maryland. 2018.
120. Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature*. 1993;362(6416):160-4.
121. Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Boat TE, Spock A, et al. A Novel Mutation in the Cystic Fibrosis Gene in Patients with Pulmonary Disease but Normal Sweat Chloride Concentrations. *New England Journal of Medicine*. 1994;331(15):974-80.
122. Zielenski J, Tsui L-C. Cystic Fibrosis : Genotypic and phenotypic variations. *Annual Review of Genetics*. 1995;29(1):777-807.
123. Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. C-terminal Truncations Destabilize the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator without Impairing Its Biogenesis: A NOVEL CLASS OF MUTATION. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(31):21873-7.

Bibliographie

124. Silvis MR, Picciano JA, Bertrand C, Weixel K, Bridges RJ, Bradbury NA. A Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Generates a Novel Internalization Sequence and Enhances Endocytic Rates. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(13):11554-60.
125. Tata F, Stanier P, Wicking C, Halford S, Kruyer H, Lench NJ, et al. Cloning the mouse homolog of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Genomics*. 1991;10(2):301-7.
126. Grubb BRaB, R. C. Pathophysiology of Gene-Targeted Mouse Models for cystic fibrosis. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*. 1999;79(1).
127. Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O, et al. An Animal Model for Cystic Fibrosis Made by Gene Targeting. *Science*. 1992;257(5073):1083.
128. Dorin JR, Dickinson P, Alton EFWF, Smith SN, Geddes DM, Stevenson BJ, et al. Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature*. 1992;359(6392):211-5.
129. Ratcliff R, Evans MJ, Cuthbert AW, MacVinish LJ, Foster D, Anderson JR, et al. Production of a severe cystic fibrosis mutation in mice by gene targeting. *Nature Genetics*. 1993;4(1):35-41.
130. O'Neal WK, Hasty P, McCray Jr PB, Casey B, RiveraPérez J, Welsh MJ, et al. A severe phenotype in mice with a duplication of exon 3 in the cystic fibrosis locus. *Human Molecular Genetics*. 1993;2(10):1561-9.
131. Hasty P, O'Neal WK, Liu K-Q, Morris AP, Bebok Z, Shumyatsky GB, et al. Severe phenotype in mice with termination mutation in exon 2 of cystic fibrosis gene. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. 1995;21(3):177-87.
132. Rozmahe R, Wilschanski M, Matin A, Plyte S, Oliver M, Auerbach W, et al. Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nature genetics*. 1996;12(3):280.
133. Zeiher BG, Eichwald E, Zabner J, Smith JJ, Puga AP, McCray PB, et al. A mouse model for the delta F508 allele of cystic fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 1995;96(4):2051-64.
134. van Doorninck JH, French PJ, Verbeek E, Peters R, Morreau H, Bijman J, et al. A mouse model for the cystic fibrosis delta F508 mutation. *The EMBO journal*. 1995;14(18):4403-11.
135. Colledge WH, Abella BS, Southern KW, Ratcliff R, Jiang C, Cheng SH, et al. Generation and characterization of a $\Delta F508$ cystic fibrosis mouse model. *Nature Genetics*. 1995;10(4):445-52.
136. Delaney SJ, Alton EW, Smith SN, Lunn DP, Farley R, Lovelock PK, et al. Cystic fibrosis mice carrying the missense mutation G551D replicate human genotype-phenotype correlations. *The EMBO journal*. 1996;15(5):955-63.
137. Dickinson P, Smith SN, Webb S, Kilanowski FM, Campbell IJ, Taylor MS, et al. The severe G480C cystic fibrosis mutation, when replicated in the mouse, demonstrates mistrafficking, normal survival and organ-specific bioelectrics. *Human molecular genetics*. 2002;11(3):243-51.
138. Davidson DJ, Dorin JR, McLachlan G, Ranaldi V, Lamb D, Doherty C, et al. Lung disease in the cystic fibrosis mouse exposed to bacterial pathogens. *Nature genetics*. 1995;9(4):351.
139. Grubb BR, Paradiso AM, Boucher RC. Anomalies in ion transport in CF mouse tracheal epithelium. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1994;267(1):C293-C300.
140. Clarke LL, Grubb BR, Yankaskas JR, Cotton CU, McKenzie A, Boucher RC. Relationship of a non-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride conductance to organ-level disease in CFTR (-/-) mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(2):479-83.
141. Puchelle E. Inflammation bronchique précoce dans la mucoviscidose. *Journal de la Société de Biologie*. 2017;196(1):29-35.

Bibliographie

- 142.Dey I, Shah K, Bradbury NA. Natural Compounds as Therapeutic Agents in the Treatment Cystic Fibrosis. *J Genet Syndr Gene Ther.* 2016;7(1):284.
- 143.Leonard A, Lebecque P, Dingemans J, Leal T. A randomized placebo-controlled trial of miglustat in cystic fibrosis based on nasal potential difference. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2012;11(3):231-6.
- 144.Van Goor F, Hadida S, Grootenhuys PDJ, Burton B, Stack JH, Straley KS, et al. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108(46):18843-8.
- 145.Schmidt BZ, Haaf JB, Leal T, Noel S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis: current perspectives. *Clin Pharmacol.* 2016;8:127-40.
- 146.Henig N, Beumer W, Anthonijsz H, Beka M, Panin N, Leal T, et al. QR-010, an RNA Therapy, Restores CFTR Function in the Saliva Secretion Assay. A37 IT WON'T BE LONG: ADVANCES IN ADULT CYSTIC FIBROSIS. *American Thoracic Society International Conference Abstracts: American Thoracic Society;* 2015. p. A1449-A.
- 147.Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell.* 2013;13(6):653-8.
- 148.Wong PY. CFTR gene and male fertility. *MHR: Basic science of reproductive medicine.* 1998;4(2):107-10.
- 149.Chan HC, Ruan YC, He Q, Chen MH, Chen H, Xu WM, et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in reproductive health and disease. *The Journal of Physiology.* 2009;587(10):2187-95.
- 150.Anthony E, Oppenheimer, Case AL, Esterly JR, Rothberg RM. Cervical mucus in cystic fibrosis: A possible cause of infertility. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 1970;108(4):673-4.
- 151.Kopito LE, Kosasky HJ, Shwachman H. Water and Electrolytes in Cervical Mucus from Patients with Cystic Fibrosis. *Fertility and Sterility.* 1973;24(7):512-6.
- 152.Johannesson M, Landgren BM, Csemiczky G, Hjelte L, Gottlieb C. Female patients with cystic fibrosis suffer from reproductive endocrinological disorders despite good clinical status. *Human Reproduction.* 1998;13(8):2092-7.
- 153.Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S. Molecular Mechanism of Pancreatic and Salivary Gland Fluid and HCO₃⁻ Secretion. *Physiological Reviews.* 2012;92(1):39-74.
- 154.Kopelman H, Corey M, Gaskin K, Durie P, Weizman Z, Forstner G. Impaired chloride secretion, as well as bicarbonate secretion, underlies the fluid secretory defect in the cystic fibrosis pancreas. *Gastroenterology.* 1988;95(2):349-55.
- 155.Plant BJ, Goss CH, Plant WD, Bell SC. Management of comorbidities in older patients with cystic fibrosis. *The Lancet Respiratory Medicine.* 2013;1(2):164-74.
- 156.Elborn JS. Cystic fibrosis. *The Lancet.* 2016;388(10059):2519-31.
- 157.Stalvey MS, Clines GA. Cystic fibrosis-related bone disease: insights into a growing problem. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity.* 2013;20(6):547-52.
- 158.Sermet-Gaudelus I, Bianchi ML, Garabédian M, Aris RM, Morton A, Hardin DS, et al. European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2011;10:S16-S23.
- 159.Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med.* 2012;18(4):509-19.
- 160.Collawn JF, Matalon S. CFTR and lung homeostasis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2014;307(12):L917-L23.

Bibliographie

161. Quinton PM. Role of epithelial HCO₃⁻ transport in mucin secretion: lessons from cystic fibrosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2010;299(6):C1222-C33.
162. Sly PD, Gangell CL, Chen L, Ware RS, Ranganathan S, Mott LS, et al. Risk Factors for Bronchiectasis in Children with Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(21):1963-70.
163. Redondo M, Keyt H, Dhar R, Chalmers JD. Global impact of bronchiectasis and cystic fibrosis. *Breathe*. 2016;12(3):222.
164. Brennan S. Innate immune activation and cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2008;9(4):271-80.
165. Dean TP, Dai Y, Shute JK, Church MK, Warner JO. Interleukin-8 Concentrations Are Elevated in Bronchoalveolar Lavage, Sputum, and Sera of Children with Cystic Fibrosis. *Pediatric Research*. 1993;34(2):159-61.
166. Santais MC, Callens E, Djebbar R, Ruff F. Intérêt potentiel des antileucotriènes dans le traitement de l'asthme et autres pathologies inflammatoires: à propos d'une nouvelle classe pharmacologique. *La Revue de Médecine Interne*. 1998;19(2):98-107.
167. Jacquot J, Tabary O, Le Rouzic P, Clement A. Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008;40(9):1703-15.
168. Breeze RG, Wheeldon EB. The cells of the pulmonary airways. *American Review of Respiratory Disease*. 1977;116(4):705-77.
169. Inayama Y, Hook G, Brody A, Jetten A, Gray T, Mahler J, et al. In vitro and in vivo growth and differentiation of clones of tracheal basal cells. *The American journal of pathology*. 1989;134(3):539.
170. Ayers M, Jeffery P. Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium. *European Respiratory Journal*. 1988;1(1):58-80.
171. Harkema J, Mariassy A, George JS, Hyde D, Plopper C. Epithelial cells of the conducting airways: a species comparison. *Lung biology in health and disease*. 1991;55:3-39.
172. Lawson GW, Van Winkle LS, Toskala E, Senior RM, Parks WC, Plopper CG. Mouse strain modulates the role of the ciliated cell in acute tracheobronchial airway injury-distal airways. *The American journal of pathology*. 2002;160(1):315-27.
173. Park K-S, Wells JM, Zorn AM, Wert SE, Laubach VE, Fernandez LG, et al. Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2006;34(2):151-7.
174. Jeffery PK. Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. *American Review of Respiratory Disease*. 1983;128(2P2):S14-S20.
175. Evans MJ, Plopper CG. The Role of Basal Cells in Adhesion of Columnar Epithelium to Airway Basement Membrane 1-3. *Am Rev Respir Dis*. 1988;138:481-3.
176. Chang MM-J, Shih L, Wu R. Pulmonary epithelium: cell types and functions. *The pulmonary epithelium in health and disease*. 2008:2-26.
177. Rhodin J, Dalhamn T. Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. 1956;44(4):345-412.
178. Frasca JM, Auerbach O, Parks VR, Jamieson JD. Electron microscopic observations of the bronchial epithelium of dogs: II. Smoking dogs. *Experimental and molecular pathology*. 1968;9(3):380-99.
179. Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Plopper CG. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. *Experimental lung research*. 2001;27(5):401-15.

Bibliographie

180. Zhu J, Rogers A, Burke-Gaffney A, Hellewell P, Jeffery P. Cytokine-induced airway epithelial ICAM-1 upregulation: quantification by high-resolution scanning and transmission electron microscopy. *European Respiratory Journal*. 1999;13(6):1318-28.
181. Travis SM, Conway B-AD, Zabner J, Smith JJ, Anderson NN, Singh PK, et al. Activity of abundant antimicrobials of the human airway. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1999;20(5):872-9.
182. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2008;1778(3):631-45.
183. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, et al. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *The Journal of cell biology*. 1998;141(2):397-408.
184. Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert DC, Thompson PJ, et al. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(1):123-33.
185. Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2003;285(5):L1166-L78.
186. Kaarteenaho-Wiik R, Soini Y. Claudin-1, -2, -3, -4, -5, and -7 in usual interstitial pneumonia and sarcoidosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2009;57(3):187-95.
187. Luissint AC, Nusrat A, Parkos CA. JAM-related proteins in mucosal homeostasis and inflammation. *Semin Immunopathol*. 2014;36(2):211-26.
188. Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *Journal of cell science*. 2004;117(1):19-29.
189. Mitic L, Anderson J. Molecular architecture of tight junctions. *Annual review of physiology*. 1998;60(1):121-42.
190. Kistner U, Garner CC, Linial M. Nucleotide binding by the synapse associated protein SAP90. *FEBS letters*. 1995;359(2-3):159-63.
191. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *The Journal of cell biology*. 1986;103(3):755-66.
192. Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(8):3460-4.
193. Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T, Tsukita S. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *The Journal of cell biology*. 2001;154(3):491-7.
194. Giepmans BNG, Moolenaar WH. The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Current Biology*. 1998;8(16):931-4.
195. Yap AS, Brieher WM, Gumbiner BM. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1997;13(1):119-46.
196. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2008;1778(3):660-9.
197. Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(11):4246-50.

Bibliographie

198. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes & Development*. 1997;11(24):3286-305.
199. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science (New York, NY)*. 2004;303(5663):1483-7.
200. Nekrasova O, Green KJ. Desmosome assembly and dynamics. *Trends in Cell Biology*. 2013;23(11):537-46.
201. Franke WW. Discovering the molecular components of intercellular junctions--a historical view. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(3):a003061-a.
202. Peifer M, Berg S, Reynolds AB. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell*. 1994;76(5):789-91.
203. Antunes MB, Cohen NA. Mucociliary clearance – a critical upper airway host defense mechanism and methods of assessment. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2007;7(1):5-10.
204. Treacy K, Tunney M, Elborn JS, Bradley JM. Mucociliary clearance in cystic fibrosis: physiology and pharmacological treatments. *Paediatrics and Child Health*. 2011;21(9):425-30.
205. Günzel D, Yu ASL. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological reviews*. 2013;93(2):525-69.
206. Ogilvie V, Passmore M, Hyndman L, Jones L, Stevenson B, Wilson A, et al. Differential global gene expression in cystic fibrosis nasal and bronchial epithelium. *Genomics*. 2011;98(5):327-36.
207. De Lisle RC. Disrupted tight junctions in the small intestine of cystic fibrosis mice. *Cell and tissue research*. 2014;355(1):131-42.
208. Asgrimsson V, Gudjonsson T, Gudmundsson GH, Baldursson O. Novel effects of azithromycin on tight junction proteins in human airway epithelia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(5):1805-12.
209. Boucher RC. Molecular insights into the physiology of the 'thin film' of airway surface liquid. *The Journal of physiology*. 1999;516 (Pt 3)(Pt 3):631-8.
210. Loxham M, Davies DE, Blume C. Epithelial function and dysfunction in asthma. *Clinical & Experimental Allergy*. 2014;44(11):1299-313.
211. Coyne CB, Vanhook MK, Gambling TM, Carson JL, Boucher RC, Johnson LG. Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol Biol Cell*. 2002;13(9):3218-34.
212. Bui S, Boisserie-Lacroix V, Ceccato F, Clouzeau H, Debelex S, Fayon M. L'inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose. *Archives de Pédiatrie*. 2012;19:S8-S12.
213. Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Gutiérrez JP, Hull J, et al. Lower Airway Inflammation in Infants and Young Children with Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1997;156(4):1197-204.
214. Nichols D, Chmiel J, Berger M. Chronic Inflammation in the Cystic Fibrosis Lung: Alterations in Inter- and Intracellular Signaling. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2008;34(2):146-62.
215. Kouadri A, El Khatib M, Cormenier J, Chauvet S, Zeinyeh W, El Khoury M, et al. Involvement of the Prion Protein in the Protection of the Human Bronchial Epithelial Barrier Against Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2018.
216. Creutzfeldt HG. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z ges Neurol Psychiat*. 1920;4722(57):1-18.
217. Jakob A. Über eigenartige erkrankungen des zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen befunde. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*. 1921;64(1):147-228.

Bibliographie

218. Cuille J. Pathologie animal-la maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? C R Acad Sci (Paris). 1936;203:1552-4.
219. Cuille J. La tremblante du mouton est bien inoculable. C R Acad Sci (Paris). 1938;206:78-9.
220. Zigas DCGaV. Degenerative disease of the central nervous system in the New Guinea, the endemic occurrence of "Kuru" in the native population. The New England Journal Of Medecine. 1957;257(20):974-8.
221. Zigas V, Gajdusek DC. Kuru: Clinical Study of a New Syndrome resembling Paralysis Agitans in Natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea. Medical Journal of Australia. 1957;2(21):745-54.
222. Gajdusek DCaZ, V. Kuru. AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE. 1959:442-69.
223. Hadlow WJ. Scrapie and kuru. The Lancet. 1959:289-90.
224. D. C. Gajdusek DCG, C. J. JR. and Alpers, M. Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzees. Nature. 1966;209:794-6.
225. Alper T, Haig WACaDA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid. Nature. 1967;214:764-6.
226. Griffith JS. Self replication and scrapie. Nature. 1967;215:1043-4.
227. Latarjet RM, B. Haig, D. A. Clarke, M. C. Tikvah Alper. Inactivation of the Scrapie Agent by near monochromatic ultraviolet light. Nature. 1970;227:1341-3.
228. Prusiner SB. Novel Proteinaceous Infectious particles cause scrapie. Science. 1982;216:136-44.
229. Dickinson AG. The scrapie replication-site hypotheses and its implications for pathogenesis. Slow Transmissible Diseases of the Nervous System. 1979;2:13-31.
230. Kimberlin RH. Scrapie agent prions or virinos. Nature. 1982;297:107-8.
231. Weissmann C. A unified theory of prion propagation. Nature. 1991;352:679-83.
232. P. A. Merz RAS, H. M. Wisniewski, and K. Iqbal. Abnormal Fibrils from Scrapie infected Brain. Acta Neuropathol (Berl). 1981;54:63- 74.
233. Tetsuyuki Kitamoto JT, Takatoshi Tashima, Iwao Takeshita, Ronald A. Barry, Stephen J. DeArmond and Stanley B. Prusiner. Amyloid Plaques in Creutzfeldt-Jakob Disease Stain with Prion Protein Antibodies. Annals of Neurology. 1986;20(2):204-8.
234. Bruno Oesch DW, Monika Wälchli, Michael P McKinley,t Stephen B. H. Kent, Ruedi Aebersold, Ronald A. Barry, Paul Tempst, David B. Teplow,S Leroy E. Hood, Stanley B. Prusiner and Charles Weissmann. A Cellular Gene Encodes Scrapie PrP 27-30 Protein. Cell. 1985;40:735-46.
235. Bruce Chesebro RR, Kathy Wehrly, Jane Nishio, Marshall Bloom, David Lechner,, Sven Bergstromt KR, Leonard Mayert, Jerry M. Keith, Claude Garon & Ashley Haase. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. Nature. 1985;315:331-3.
236. K. Basler BO, M. Scott,, D. Westaway MW, D. F. Groth, M. P McKinley, S. B. Prusiner and C. Weissmann. Scrapie and Cellular PrP Isoforms Are Encoded by the Same Chromosomal Gene. Cell. 1986;46:417-28.
237. Collinge J, Palmer MS, Dryden AJ. Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. The Lancet. 1991;337(8755):1441-2.
238. Weissmann C. Molecular Genetics of Transmissible Spongiform Encephalopathies. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 1999;274(1):3-6.

Bibliographie

239. Duffy P. Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med.* 1974;290:692-3.
240. J G Heckmann CJGL, F Petruch, A Druschky, C Erb, P Brown, B Neundörfer. Transmission of Creutzfeldt Jakob disease via a corneal transplant. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry.* 1997;63:388-90.
241. Bernoulli CS, J. Baumgartner, G. Regli, F. Rabinowicz, T. Gajdusek, D. C. Gibbs, C. J. JR. Danger of accidental person to person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. *The Lancet.* 1977:478-9.
242. Hewitt PE, Llewelyn CA, Mackenzie J, Will RG. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: results of the UK Transfusion Medicine Epidemiological Review study. *Vox Sang.* 2006;91(3):221-30.
243. Wroe SJ, Pal S, Siddique D, Hyare H, Macfarlane R, Joiner S, et al. Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *The Lancet.* 2006;368(9552):2061-7.
244. Lewis PA, Tattum MH, Jones S, Bhele D, Batchelor M, Clarke AR, et al. Codon 129 polymorphism of the human prion protein influences the kinetics of amyloid formation. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 8):2443-9.
245. E. Mitrova´ VM, V. Jovankovic´ova´ , D. Slivarichova´ and L. Wso´lov. Creutzfeldt–Jakob disease risk and PRNP codon 129 polymorphism necessity to revalue current data. *European Journal of Neurology.* 2005;12:998-1001.
246. Jolanta Bratosiewicz PPL, Jerzy Kulczycki and Radzislaw Kordek. Codon 129 polymorphisms of the PRNP gene in normal Polish population and in Creutzfeldt-Jakob Disease, and the search for new mutations in PRNP gene. *Acta Neurobiol Exp.* 2001;61:151-6.
247. Korth C MB, Cohen FE, Prusiner SB. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(17):9836-41.
248. Doh-Ura KI, T. and Caughey, B. Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *JOURNAL OF VIROLOGY.* 2000;74(10):4894-7.
249. Michael D. Geschwind ALK, Katherine S. Wong, Aissa Haman, Gillian Devereux, Benjamin J. Raudabaugh, David Y. Johnson, Charles C. Torres-Chae, Ron Finley, Paul Garcia, Julie N. Thai, Hugo Q. Cheng, John M. Neuhaus, Sven A. Forner, Jacques L. Duncan, Katherine L. Possin, Stephen J. DeArmond, Stanley B. Prusiner, Bruce L. Miller. Quinacrine treatment trial for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology.* 2013;81:2015-23.
250. Haik S, Marcon G, Mallet A, Tettamanti M, Welaratne A, Giaccone G, et al. Doxycycline in Creutzfeldt-Jakob disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology.* 2014;13(2):150-8.
251. Westaway D, Goodman PA, Mirenda CA, McKinley MP, Carlson GA, Prusiner SB. Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell.* 1987;51(4):651-62.
252. Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, et al. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann–Sträussler syndrome. *Nature.* 1989;338(6213):342.
253. Inyool Y. Lee DW, Arian F.A. Smit, Kai Wang,, Jason Seto LC, Chetana Acharya, Mike Ankener, Dale Baskin, Carol Cooper, Hong Yao, Stanley B. Prusiner and Leroy E. Hood. Complete Genomic Sequence and Analysis of the Prion Protein Gene Region from Three Mammalian Species. *Genome Res.* 1998;8(1022-1037).
254. McKnight S, Tjian R. Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell.* 1986;46(6):795-805.
255. Sukhvir P. Mahala EAA, Michael Antonioub, John Collingea. Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene.* 2001;268:105-14.

Bibliographie

256. Durnam D, Palmiter R. Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *Journal of Biological Chemistry*. 1981;256(11):5712-6.
257. Murata M, Gong P, Suzuki K, Koizumi S. Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes. *Journal of cellular physiology*. 1999;180(1):105-13.
258. Varela-Nallar L, Toledo EM, Chacon MA, Inestrosa NC. The functional links between prion protein and copper. *Biological research*. 2006;39(1):39-44.
259. Roland Riek SH, Gerhard Wider, Martin Billeter, Rudi Glockshuber and Kurt Wüthrich. NMR structure of the mouse prion protein PrP (121-131). *Nature*. 1996;382:180-2.
260. Ralph Zahn AL, Thorsten Lühns, Roland Riek, Christine von Schroetter, Francisco Lopez Garcia, Martin Billeter, Luigi Calzolari GW, and Kurt Wüthrich. NMR solution structure of the human prion protein. *PNAS*. 2000;97(1):145-50.
261. Hornemann S, Glockshuber R. Autonomous and reversible folding of a soluble amino-terminally truncated segment of the mouse prion protein. Elsevier; 1996.
262. Hornshaw MP, McDermott J, Candy J, Lakey J. Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;214(3):993-9.
263. Hornshaw M, McDermott J, Candy J. Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;207(2):621-9.
264. Viles JH, Cohen FE, Prusiner SB, Goodin DB, Wright PE, Dyson HJ. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(5):2042-7.
265. Harrison CF, Lawson VA, Coleman BM, Kim YS, Masters CL, Cappai R, et al. Conservation of a glycine-rich region in the prion protein is required for uptake of prion infectivity. *J Biol Chem*. 2010;285(26):20213-23.
266. Irene J. Barrette GP, Patrick Gendron, F. Major. Pseudoknots in prion protein mRNAs confirmed by comparative sequence analysis and pattern searching. Irene J Barrette, Guylaine Poisson, Patrick Gendron, F Major. 2001;29(3):753-8.
267. Staple DW, Butcher SE. Pseudoknots: RNA structures with diverse functions. *PLoS Biol*. 2005;3(6):e213.
268. Caughey B, Raymond GJ. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(27):18217-23.
269. Hornemann SaG, R. A scrapie-like unfolding intermediate of the prion protein domain PrP(121–231) induced by acidic pH. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:6010-4.
270. Caughey B. In vitro expression and biosynthesis of prion protein. *Transmissible Spongiform Encephalopathies*:: Springer; 1991. p. 93-107.
271. Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A, et al. Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1989;274(1):1-13.
272. Caughey BR, R. E. Ernst, D., Buchmeier MJC, B. Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *Journal of virology*. 1989;63(1):175-81.
273. Lehmann S, Harris DA. Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(34):21479-87.

Bibliographie

274. Rogers M, Taraboulos A, Scott M, Groth D, Prusiner SB. Intracellular accumulation of the cellular prion protein after mutagenesis of its Asn-linked glycosylation sites. *Glycobiology*. 1990;1(1):101-9.
275. Kascsak RJ, Rubenstein R, Merz PA, Carp RI, Robakis NK, Wisniewski HM, et al. Immunological comparison of scrapie-associated fibrils isolated from animals infected with four different scrapie strains. *Journal of Virology*. 1986;59(3):676.
276. Monari L, Chen SG, Brown P, Parchi P, Petersen RB, Mikol J, et al. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(7):2839.
277. Turk E, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB. Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *European Journal of Biochemistry*. 1988;176(1):21-30.
278. Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*. 1987;51(2):229-40.
279. Harris DA. Cellular Biology of Prion Diseases. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. 1999:429-44.
280. Borchelt DR, Telling G, Rogers M, Stahl N, Prusiner SB. Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycoinositol phospholipid anchor. *Glycobiology*. 1993;3(4):319-29.
281. Low MG. The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. 1989;988(3):427-54.
282. Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L, Prusiner SB. Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *The Journal of cell biology*. 1995;129(1):121-32.
283. Mange A, Beranger F, Peoc'h K, Onodera T, Frobert Y, Lehmann S. Alpha- and beta-cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biol Cell*. 2004;96(2):125-32.
284. McMahon HE, Mange A, Nishida N, Creminon C, Casanova D, Lehmann S. Cleavage of the amino terminus of the prion protein by reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2001;276(3):2286-91.
285. Show-Ling Shyng MTH, and David A. Harris. A Prion Protein Cycles between the Cell Surface and an Endocytic Compartment in Cultured Neuroblastoma Cell. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 1993;268(21):15922-8.
286. Show-Ling Shyng JEH, and David A. Harris. A Glycolipid-anchored Prion Protein Is Endocytosed via Clathrin-coated Pits. *The Journal of Cell Biology*. 1994;125(6).
287. Schmid SL. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting : An integrated process. *Annual Review of Biochemistry*. 1997;66(1):511-48.
288. Peters PJ, Mironov A, Jr., Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, et al. Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *The Journal of cell biology*. 2003;162(4):703-17.
289. Yifat Yedidia LH, Salit Tzaban, Anat Yanai and Albert Taraboulos. Proteasome and ubiquitin are involved in the turnover of wild-type prion protein. *The EMBO Journal*. 2001;20(19):5383-91.
290. Lindquist JMaS. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *PNAS*. 2001;98(26):14955-60.
291. Robakis NKS, P. R. Wolfe, G. C. Rubenstein, R. Carp, R. I. and Innis, M. A. Isolation of a cDNA clone encoding the leader peptide of prion protein and expression of the homologous gene in various tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:6377-81.
292. Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, et al. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology*. 1992;42(1):149.

Bibliographie

- 293.Motohiro Horiuchi NY, Tetsuya Ikeda, Naotaka Ishiguro and Morikazu Shinagawa. A cellular form of prion protein (PrP^c) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *Journal of General Virology*. 1995;76:2583-7.
- 294.Harris DA, Lele P, Snider WD. Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(9):4309.
- 295.Manson JW, J. D. Thomson, V. McBride, P. Kaufman, M. H. and Hope, J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*. 1992;115:117-22.
- 296.Jaegly A, Mouthon F, Peyrin J-M, Camugli B, Deslys J-P, Dormont D. Search for a Nuclear Localization Signal in the Prion Protein. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 1998;11(3):127-33.
- 297.Lorenz H, Windl O, Kretzschmar HA. Cellular phenotyping of secretory and nuclear prion proteins associated with inherited prion diseases. *J Biol Chem*. 2002;277(10):8508-16.
- 298.Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Sano K, et al. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrPC) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrPC. *Neuroscience letters*. 2005;374(2):98-103.
- 299.Faris R, Moore RA, Ward A, Race B, Dorward DW, Hollister JR, et al. Cellular prion protein is present in mitochondria of healthy mice. *Sci Rep*. 2017;7:41556.
- 300.Cabral ALB, Lee KS, Martins VR. Regulation of the Cellular Prion Protein Gene Expression Depends on Chromatin Conformation. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(7):5675-82.
- 301.Westaway D, Cooper C, Turner S, Da Costa M, Carlson GA, Prusiner SB. Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(14):6418-22.
- 302.Premzl M, Delbridge M, Gready JE, Wilson P, Johnson M, Davis J, et al. The prion protein gene: identifying regulatory signals using marsupial sequence. *Gene*. 2005;349:121-34.
- 303.Shyu W-C, Harn H-J, Saeki K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Onodera T, et al. Molecular modulation of expression of prion protein by heat shock. *Molecular Neurobiology*. 2002;26(1):1-12.
- 304.Varela-Nallar L, Toledo EM, Larrondo LF, Cabral ALB, Martins VR, Inestrosa NC. Induction of cellular prion protein gene expression by copper in neurons. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2006;290(1):C271-C81.
- 305.Miele G, Alejo Blanco AR, Baybutt H, Horvat S, Manson J, Clinton M. Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene. *Gene expression*. 2003;11(1):1-12.
- 306.Mobley WC, Neve RL, Prusiner SB, McKinley MP. Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(24):9811-5.
- 307.Lazarini F, Castelnaup, Chermann J-F, Deslys J-P, Dormont D. Modulation of prion protein gene expression by growth factors in cultured mouse astrocytes and PC-12 cells. *Molecular Brain Research*. 1994;22(1):268-74.
- 308.Zawlik I, Witusik M, Hulas-Bigoszewska K, Piaskowski S, Szybka M, Golanska E, et al. Regulation of PrPC expression: Nerve growth factor (NGF) activates the prion gene promoter through the MEK1 pathway in PC12 cells. *Neuroscience Letters*. 2006;400(1):58-62.
- 309.Shyu W-C, Kao M-C, Chou W-Y, Hsu Y-D, Soong B-W. Heat shock modulates prion protein expression in human NT-2 cells. *NeuroReport*. 2000;11(4):771-4.
- 310.Shyu WC, Chen CP, Saeki K, Kubosaki A, Matusmoto Y, Onodera T, et al. Hypoglycemia enhances the expression of prion protein and heat-shock protein 70 in a mouse neuroblastoma cell line. *Journal of Neuroscience Research*. 2005;80(6):887-94.

Bibliographie

311. Shyu W-C, Lin S-Z, Saeki K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Onodera T, et al. Hyperbaric Oxygen Enhances the Expression of Prion Protein and Heat Shock Protein 70 in a Mouse Neuroblastoma Cell Line. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2004;24(2):257-68.
312. Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Ding DC, Li KW, Chen SF, et al. Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. *J Neurosci*. 2005;25(39):8967-77.
313. Pammer J, Cross HS, Frobert Y, Tschachler E, Oberhuber G. The pattern of prion-related protein expression in the gastrointestinal tract. *Virchows Archiv*. 2000;436(5):466-72.
314. Johannes Pammer W, Tschachler E. Human Keratinocytes Express Cellular Prion-Related Protein in Vitro and during inflammatory skin disease. *American Journal of Pathology*. 1998;153(5):1353-8.
315. Sauer H, Dagdanova A, Hescheler J, Wartenberg M. Redox-regulation of intrinsic prion expression in multicellular prostate tumor spheroids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;27(11):1276-83.
316. Stöckel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB. Prion Protein Selectively Binds Copper(II) Ions. *Biochemistry*. 1998;37(20):7185-93.
317. Garnett AP, Viles JH. Copper binding to the octarepeats of the prion protein. Affinity, specificity, folding, and cooperativity: insights from circular dichroism. *J Biol Chem*. 2003;278(9):6795-802.
318. Armendariz AD, Gonzalez M, Loguinov AV, Vulpe CD. Gene expression profiling in chronic copper overload reveals upregulation of PRNP and App. *Physiol Genomics*. 2004;20(1):45-54.
319. Nadia Alfaidy SC, Sandrine Donadio-Andrei, Aude Salomon, Yasmina Saoudi, Pierre Richaud, Catherine Aude-Garcia, Pascale Hoffmann, Annie Andrieux, Jean-Marc Moulis, Jean-Jacques Feige, and Mohamed Benharouga. Prion Protein Expression and Functional Importance in Developmental Angiogenesis: Role in Oxidative Stress and Copper Homeostasis. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;18(4):400-11.
320. Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral ALB, Veiga SS, et al. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Molecular Brain Research*. 2000;76(1):85-92.
321. Timpl R, Brown JC. The laminins. *Matrix Biology*. 1994;14(4):275-81.
322. Luckenbill-Edds L. Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Research Reviews*. 1997;23(1):1-27.
323. Chen Z-L, Strickland S. Neuronal Death in the Hippocampus Is Promoted by Plasmin-Catalyzed Degradation of Laminin. *Cell*. 1997;91(7):917-25.
324. Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, Roesler R, Izquierdo I, Cavalheiro EA, et al. Increased Sensitivity to Seizures in Mice Lacking Cellular Prion Protein. *Epilepsia*. 1999;40(12):1679-82.
325. Hansruedi Büeler MF, Yolande Lang, Horst Bluethmann, Hans-Peter Lipp, Stephen J. DeArmond, Stanley B. Prusiner, Michel Aguet & Charles Weissmann. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*. 1992;356:577-82.
326. Roucou X, Gains M, LeBlanc AC. Neuroprotective functions of prion protein. *Journal of Neuroscience Research*. 2004;75(2):153-61.
327. van Delft MF, Huang DCS. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Research*. 2006;16:203.
328. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 2000;407:802.
329. Li A, Harris DA. Mammalian Prion Protein Suppresses Bax-induced Cell Death in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(17):17430-4.

Bibliographie

330. Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, Blättler T, Brandner S, Götz J, et al. Expression of Amino-Terminally Truncated PrP in the Mouse Leading to Ataxia and Specific Cerebellar Lesions. *Cell*. 1998;93(2):203-14.
331. Li A, Christensen HM, Stewart LR, Roth KA, Chiesa R, Harris DA. Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105–125. *The EMBO Journal*. 2007;26(2):548.
332. Nishida N, Tremblay P, Sugimoto T, Shigematsu K, Shirabe S, Petromilli C, et al. A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1999;79(6):689-97.
333. Shyng S-L, Lehmann S, Moulder KL, Harris DA. Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrP^C, in cultured cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(50):30221-9.
334. Donne DG, Viles JH, Groth D, Mehlhorn I, James TL, Cohen FE, et al. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP (29–231): the N terminus is highly flexible. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(25):13452-7.
335. González-Iglesias R, Pajares MaA, Ocal C, Carlos Espinosa J, Oesch B, Gasset Ma. Prion Protein Interaction with Glycosaminoglycan Occurs with the Formation of Oligomeric Complexes Stabilized by Cu(II) Bridges. *Journal of Molecular Biology*. 2002;319(2):527-40.
336. Leclerc E, Serban H, Prusiner S, Burton D, Williamson R. Copper induces conformational changes in the N-terminal part of cell-surface PrP^C. *Archives of virology*. 2006;151(11):2103-9.
337. Singh A, Mohan ML, Isaac AO, Luo X, Petrak J, Vyoral D, et al. Prion protein modulates cellular iron uptake: a novel function with implications for prion disease pathogenesis. *PloS one*. 2009;4(2):e4468.
338. Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*. 1997;390(6661):684.
339. Wysokinska Z. Metal trace elements and their role in the animal organism. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej*. 1964;18:593-611.
340. Elbowicz-Waniewska Z. Biological role of copper compounds. *Polski tygodnik lekarski (Warsaw, Poland: 1960)*. 1968;23(23):882-4.
341. O'Dell BL. Biochemistry of copper. *Med Clin North Am*. 1976;60(4):687-703.
342. Solomons NW. Biochemical, metabolic, and clinical role of copper in human nutrition. *Journal of the American College of Nutrition*. 1985;4(1):83-105.
343. Camakaris J, Voskoboinik I, Mercer JF. Molecular Mechanisms of Copper Homeostasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999;261(2):225-32.
344. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*. 1985;1(1):3-25.
345. Goka TJ, Stevenson RE, Hefferan PM, Howell RR. Menkes disease: a biochemical abnormality in cultured human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1976;73(2):604.
346. Herron BE. Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Ophthalmic Semin*. 1976;1(1):63-9.
347. Hunt D. Copper and Neurological Function. *Ciba Foundation Symposium 79 - Biological Roles of Copper* 2008.
348. Madsen E, Gitlin JD. Copper deficiency. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2007;23(2):187-92.

Bibliographie

349. Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, et al. Evidence of Presynaptic Location and Function of the Prion Protein. *The Journal of Neuroscience*. 1999;19(20):8866.
350. Stuermer CAO, Plattner H. The "lipid raft" microdomain proteins reggie-1 and reggie-2 (flotillins) are scaffolds for protein interaction and signalling. *Biochemical Society Symposium*. 2005;72:109.
351. Quaglio E, Chiesa R, Harris DA. Copper Converts the Cellular Prion Protein into a Protease-resistant Species That Is Distinct from the Scrapie Isoform. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(14):11432-8.
352. Olga V, Bocharova LB, Vadim V, Salnikov, and Ilia V. Baskakov. Copper(II) Inhibits in Vitro Conversion of Prion Protein into Amyloid Fibrils. *Biochemistry*. 2005;44:6776-87.
353. Keen CL, Ensunsa JL, Watson MH, Baly DL, Donovan SM, Monaco MH, et al. Nutritional aspects of manganese from experimental studies. *Neurotoxicology*. 1999;20(2-3):213-23.
354. Aschner JL, Aschner M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine*. 2005;26(4):353-62.
355. Galvani P, Fumagalli P, Santagostino A. Vulnerability of mitochondrial complex I in PC12 cells exposed to manganese. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology*. 1995;293(4):377-83.
356. Gunter TE, Gavin CE, Aschner M, Gunter KK. Speciation of manganese in cells and mitochondria: A search for the proximal cause of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 2006;27(5):765-76.
357. Castilho RF, Ward MW, Nicholls DG. Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Acute Glutamate Excitotoxicity in Cultured Cerebellar Granule Cells. *Journal of Neurochemistry*. 1999;72(4):1394-401.
358. Hirata Y. Manganese-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicology and Teratology*. 2002;24(5):639-53.
359. Stredrick DL, Stokes AH, Worst TJ, Freeman WM, Johnson EA, Lash LH, et al. Manganese-Induced Cytotoxicity in Dopamine-Producing Cells. *Neurotoxicology*. 2004;25(4):543-53.
360. Vellareddy Anantharam MK, Jarrad Wagner, Siddharth Kaul and Anumantha G. Kanthasamy. Caspase-3-Dependent Proteolytic Cleavage of Protein Kinase C δ Is Essential for Oxidative Stress-Mediated Dopaminergic Cell Death after Exposure to Methylcyclopentadienyl Manganese Tricarbonyl. *Journal of Neuroscience*. 2002;22(5):1738-51.
361. Kaul S, Kanthasamy A, Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy AG. Caspase-3 dependent proteolytic activation of protein kinase C δ mediates and regulates 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced apoptotic cell death in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress in dopaminergic degeneration. *European Journal of Neuroscience*. 2003;18(6):1387-401.
362. Jackson GS, Murray I, Hosszu LLP, Gibbs N, Waltho JP, Clarke AR, et al. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(15):8531.
363. Tsenkova RN, Iordanova IK, Toyoda K, Brown DR. Prion protein fate governed by metal binding. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;325(3):1005-12.
364. Choi CJ, Anantharam V, Saetveit NJ, Houk RS, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. Normal Cellular Prion Protein Protects against Manganese-Induced Oxidative Stress and Apoptotic Cell Death. *Toxicological Sciences*. 2007;98(2):495-509.
365. Hooper WSSPaNM. Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Current Biology*. 2001;11:519-23.
366. Watt NT, Taylor DR, Kerrigan TL, Griffiths HH, Rushworth JV, Whitehouse IJ, et al. Prion protein facilitates uptake of zinc into neuronal cells. *Nature Communications*. 2012;3:1134.

Bibliographie

367. Brown DRW, B. S. Hafiz, F. Clive, C. Haswell, S. J. and Jones, I. M. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J.* 1999;344:1-5.
368. Hutter G, Heppner FL, Aguzzi A. No Superoxide Dismutase Activity of Cellular Prion Protein in vivo. *Biological Chemistry* 2003. p. 1279.
369. Brown DR, Besinger A. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochemical Journal.* 1998;334(2):423.
370. Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA. Prion Protein-Deficient Cells Show Altered Response to Oxidative Stress Due to Decreased SOD-1 Activity. *Experimental Neurology.* 1997;146(1):104-12.
371. Morel E, Fouquet S, Chateau D, Yvernault L, Frobert Y, Pincon-Raymond M, et al. The cellular prion protein PrP^c is expressed in human enterocytes in cell-cell junctional domains. *J Biol Chem.* 2004;279(2):1499-505.
372. Heppner FL, Christ AD, Klein MA, Prinz M, Fried M, Kraehenbuhl J-P, et al. Transepithelial prion transport by M cells. *Nature Medicine.* 2001;7:976.
373. Okamoto M, Furuoka H, Horiuchi M, Noguchi T, Hagiwara K, Muramatsu Y, et al. Experimental Transmission of Abnormal Prion Protein (PrP^{Sc}) in the Small Intestinal Epithelial Cells of Neonatal Mice. *Veterinary Pathology.* 2003;40(6):723-7.
374. De Keukeleire B, Donadio S, Micoud J, Lechardeur D, Benharouga M. Human cellular prion protein hPrP^c is sorted to the apical membrane of epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354(4):949-54.
375. Morel E, Fouquet S, Strup-Perrot C, Pichol Thievend C, Petit C, Loew D, et al. The cellular prion protein PrP^c is involved in the proliferation of epithelial cells and in the distribution of junction-associated proteins. *PLoS One.* 2008;3(8):e3000.
376. Viegas P, Chaverot N, Enslin H, Perrière N, Couraud P-O, Cazaubon S. Junctional expression of the prion protein PrP^c by brain endothelial cells: a role in trans-endothelial migration of human monocytes. *Journal of Cell Science.* 2006;119(22):4634.
377. Megra BW, Eugenin EA, Berman JW. Inflammatory mediators reduce surface PrP^c on human BMVEC resulting in decreased barrier integrity. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 2018;98(10):1347-59.
378. Azeleira CA, Lin C-M, Abcouwer SF, Ambrósio AF, Antonetti DA. TNF- α signals through PKC ζ /NF- κ B to alter the tight junction complex and increase retinal endothelial cell permeability. *Diabetes.* 2010;59(11):2872-82.
379. Gourdain P, Ballerini C, Nicot AB, Carnaud C. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in prion protein (PrP^c)-null mice: evidence for a critical role of the central nervous system. *Journal of Neuroinflammation.* 2012;9(1):25.
380. Hoshino S, Inoue K, Yokoyama T, Kobayashi S, Asakura T, Teramoto A, et al., editors. Prions prevent brain damage after experimental brain injury: a preliminary report. *Brain Edema XII; 2003* //; Vienna: Springer Vienna.
381. Spudich A, Frigg R, Kilic E, Kilic Ü, Oesch B, Raeber A, et al. Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: Role of ERK-1/-2 and STAT-1. *Neurobiology of Disease.* 2005;20(2):442-9.
382. Gadotti VM, Zamponi GW. Cellular prion protein protects from inflammatory and neuropathic pain. *Molecular Pain.* 2011;7(1):59.
383. Liu J, Zhao D, Liu C, Ding T, Yang L, Yin X, et al. Prion protein participates in the protection of mice from lipopolysaccharide infection by regulating the inflammatory process. *Journal of Molecular Neuroscience.* 2015;55(1):279-87.

Bibliographie

384. Salvesen Ø, Reiten MR, Espenes A, Bakkebø MK, Tranulis MA, Ersdal C. LPS-induced systemic inflammation reveals an immunomodulatory role for the prion protein at the blood-brain interface. *Journal of Neuroinflammation*. 2017;14(1):106.
385. Martin GR, Keenan CM, Sharkey KA, Jirik FR. Endogenous Prion Protein Attenuates Experimentally Induced Colitis. *The American Journal of Pathology*. 2011;179(5):2290-301.
386. Petit CS, Barreau F, Besnier L, Gandille P, Riveau B, Chateau D, et al. Requirement of cellular prion protein for intestinal barrier function and mislocalization in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2012;143(1):122-32 e15.
387. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*. 1998;16(1):225-60.
388. Moynagh PN. The NF- κ B pathway. *Journal of cell science*. 2005;118(20):4589-92.
389. Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M. Dissection of the NF- κ B signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell death and differentiation*. 2006;13(5):861.
390. Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona A-M, Sébire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology*. 2001;56(10):1278-84.
391. Wu G-R, Mu T-C, Gao Z-X, Wang J, Sy M-S, Li C-Y. Prion protein is required for tumor necrosis factor α (TNF α)-triggered nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling and cytokine production. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292(46):18747-59.
392. Zaas DW, Duncan M, Rae Wright J, Abraham SN. The role of lipid rafts in the pathogenesis of bacterial infections. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2005;1746(3):305-13.
393. Watarai M, Kim S, Erdenebaatar J, Makino S-i, Horiuchi M, Shirahata T, et al. Cellular Prion Protein Promotes Brucella Infection into Macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003;198(1):5.
394. Watarai M. Interaction between Brucella abortus and cellular prion protein in lipid raft microdomains. *Microbes and Infection*. 2004;6(1):93-100.
395. Fontes P, Alvarez-Martinez M-T, Gross A, Carnaud C, Köhler S, Liautard J-P. Absence of Evidence for the Participation of the Macrophage Cellular Prion Protein in Infection with Brucella suis. *Infection and Immunity*. 2005;73(10):6229.
396. Pasupuleti M, Roupe M, Rydengård V, Surewicz K, Surewicz WK, Chalupka A, et al. Antimicrobial Activity of Human Prion Protein Is Mediated by Its N-Terminal Region. *PLOS ONE*. 2009;4(10):e7358.
397. Hafner-Bratkovič I, Benčina M, Fitzgerald KA, Golenbock D, Jerala R. NLRP3 inflammasome activation in macrophage cell lines by prion protein fibrils as the source of IL-1 β and neuronal toxicity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012;69(24):4215-28.
398. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Molecular Cell*. 2002;10(2):417-26.
399. Lindestam Arlehamn CS, Evans TJ. Pseudomonas aeruginosa pilin activates the inflammasome. *Cellular Microbiology*. 2011;13(3):388-401.
400. Ding T, Zhou X, Kouadir M, Shi F, Yang Y, Liu J, et al. Cellular Prion Protein Participates in the Regulation of Inflammatory Response and Apoptosis in BV2 Microglia During Infection with Mycobacterium bovis. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2013;51(1):118-26.
401. Nasu-Nishimura Y, Taniuchi Y, Nishimura T, Sakudo A, Nakajima K, Ano Y, et al. Cellular prion protein prevents brain damage after encephalomyocarditis virus infection in mice. *Archives of Virology*. 2008;153(6):1007-12.

Bibliographie

402. Hayashi Y, Tomimatsu Y, Suzuki H, Yamada J, Wu Z, Yao H, et al. The intra-arterial injection of microglia protects hippocampal CA1 neurons against global ischemia-induced functional deficits in rats. *Neuroscience*. 2006;142(1):87-96.
403. Chida J, Hara H, Yano M, Uchiyama K, Das NR, Takahashi E, et al. Prion protein protects mice from lethal infection with influenza A viruses. *PLOS Pathogens*. 2018;14(5):e1007049.
404. Weissmann C, Flechsig E. PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *British Medical Bulletin*. 2003;66(1):43-60.
405. Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp H-P, DeArmond SJ, et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*. 1992;356(6370):577-82.
406. Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, et al. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature*. 1996;380(6574):528-31.
407. Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, et al. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *Journal of molecular biology*. 1999;292(4):797-817.
408. Fischer M, Rülcke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, et al. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *The EMBO journal*. 1996;15(6):1255-64.
409. Tobler I, Gaus S, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rülcke T, et al. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*. 1996;380(6575):639.
410. Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, et al. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*. 1994;370(6487):295.
411. Lobão-Soares B, Walz R, Prediger RDS, Freitas RL, Calvo F, Bianchin MM, et al. Cellular prion protein modulates defensive attention and innate fear-induced behaviour evoked in transgenic mice submitted to an agonistic encounter with the tropical coral snake *Oxyrhopus guibei*. *Behavioural brain research*. 2008;194(2):129-37.
412. Gadotti VM, Bonfield SP, Zamponi GW. Depressive-like behaviour of mice lacking cellular prion protein. *Behavioural brain research*. 2012;227(2):319-23.
413. Lobão-Soares B, Walz R, Carlotti Jr CG, Sakamoto AC, Calvo F, Terzian ALB, et al. Cellular prion protein regulates the motor behaviour performance and anxiety-induced responses in genetically modified mice. *Behavioural brain research*. 2007;183(1):87-94.
414. Strom A, Wang G-S, Scott FW. Impaired glucose tolerance in mice lacking cellular prion protein. *Pancreas*. 2011;40(2):229-32.
415. Bribián A, Fontana X, Llorens F, Gavín R, Reina M, García-Verdugo JM, et al. Role of the cellular prion protein in oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation in the developing and adult mouse CNS. *PloS one*. 2012;7(4):e33872.
416. Miele G, Jeffrey M, Turnbull D, Manson J, Clinton M. Ablation of cellular prion protein expression affects mitochondrial numbers and morphology. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;291(2):372-7.
417. de Almeida CJ, Chiarini LB, da Silva JP, e Silva PM, Martins MA, Linden R. The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *Journal of leukocyte biology*. 2005;77(2):238-46.
418. Jouvin-Marche E, Attuil-Audenis V, Aude-Garcia C, Rachidi W, Zabel M, Podevin-Dimster V, et al. Overexpression of cellular prion protein induces an antioxidant environment altering T cell development in the thymus. *The Journal of Immunology*. 2006;176(6):3490-7.

Bibliographie

419. Culpier M, Messiaen S, Boucreaux D, Eloit M. Axotomy-induced motoneuron death is delayed in mice overexpressing PrP^c. *Neuroscience*. 2006;141(4):1827-34.
420. Rangel Rincones AH, Madroñal N, Gruart i Massó A, Gavín Marín R, Llorens Torres F, Sumoy L, et al. Regulation of GABA (A) and glutamate receptor expression, synaptic facilitation and long-term potentiation in the hippocampus of prion mutant mice. *PLoS ONE*, 2009, 4 (10): e7592. 2009.
421. Westaway D, DeArmond SJ, Cayetano-Canlas J, Groth D, Foster D, Yang S-L, et al. Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell*. 1994;76(1):117-29.
422. Steele AD, Emsley JG, Özdinler PH, Lindquist S, Macklis JD. Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(9):3416-21.
423. Thackray AM, Bujdoso R. PrP^c expression influences the establishment of herpes simplex virus type 1 latency. *Journal of virology*. 2002;76(5):2498-509.

Annexes

A – Publications

- ✓ **Involvement of the prion protein in the protection of the human bronchial epithelial barrier against oxidative stress.**
Antioxidants and Redox Signaling (2019).
DOI: 10.1089/ars.2018.7500.

- ✓ **Copper Homeostasis and Oxidative Stress in Polarized Cystic Fibrosis Human Bronchial Epithelia: Role in Inflammation Responses.**
Soumit dans la revue “Journal of inflammation”

B – Curriculum Vitae

Original Research Communication

Involvement of the Prion Protein in the Protection of the Human Bronchial Epithelial Barrier against Oxidative Stress

Amal Kouadri¹, Mariam El Khatib¹, Johanna Cormenier¹, Sylvain Chauvet¹, Wael Zeinyeh¹,
Micheline El Khoury¹, Laurence Macari¹, Pierre Richaud³, Christelle Coraux⁴, Isabelle
Michaud-Soret¹, Nadia Alfaidy² and Mohamed Benharouga¹

¹ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5249, CEA, BIG, CBM, F-38000 Grenoble, France.

² Univ. Grenoble Alpes, INSERM U1036, CEA, BIG, BCI, F-38000 Grenoble, France.

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

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

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

Keywords: Prion protein, Bronchial epithelium, Oxidative stress, Copper, Junctional
proteins

Address correspondence to:

Dr. Mohamed Benharouga

LCBM-UMR5249

DRF-BIG, CEA-Grenoble

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

Téléphone: (33)-4-38-78-44-51

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

E-mail: mohamed.benharouga@cea.fr

Word count: 6106

Reference numbers: 73

Greyscale illustrations: 7

Color illustrations: 3 (online 3)

Abstract

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

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

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

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

Introduction

The bronchial epithelium forms a critical barrier that is continually exposed to a variety of environmental agents such as pollutants, allergens, particles and microorganisms that are capable of causing tissue injury. These injuries are normally countered by the establishment of an effective line of defense and repair mechanisms (51,65). The periciliary surface fluid and mucus form the first line of defense of the airways, including the production of abundant mediators and innate airway immune responses (31). The second line is physical and consists of three main types of intercellular junctional complexes responsible for the sealing of the epithelium: tight junctions, adherens junctions and desmosomes (25,31,34). The disruption of the intercellular junction of bronchial epithelium is associated with an increase in epithelial cell permeability and an invasion by infectious agents (37,42,69). This phenomenon constitutes a hallmark of inflammatory and chronic infectious diseases, such as cystic fibrosis (CF) (10). One of the parameters that was reported to contribute to the airway epithelial barrier's injury and dysfunction is the oxidative stress status, induced by endogenous productions of reactive oxygen species (ROS) (26,39,47). To protect and repair the injured epithelial barrier following exposure to an oxidative stress, the cells setup an anti-oxidative system that involves molecules such as vitamins E and C, with the ability to scavenger intracellular free radicals; peptides such as glutathione that chelate free copper; and enzymes such as catalase and superoxide dismutase (SOD) (45,68).

The cellular prion protein (PrP^C) is one of the proteins that have been reported to be involved both in antioxidant protection (1,33) and in maintaining the integrity of the intestinal epithelial barrier (49,54). PrP^C is a glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)-anchored glycoprotein known for its unique ability to undergo structural conversion from a normal isoform (PrP^C) into a pathogenic conformer known as scrapie (PrP^{Sc}) (57). The accumulation of PrP^{Sc} aggregates in the brain is a distinctive feature of transmissible spongiform encephalopathies (TSE), a group of animal and human lethal neurodegenerative diseases (14). The physiological role of the cellular PrP has mainly been associated with stress-protection (60,73), copper homeostasis (2) and neuronal excitability (38). Other functions related to cellular processes and metabolism have also been reported for this protein (11). In epithelial cells, PrP^C localization is still a matter of

discussion and the majority of data were obtained in enterocytes and MDCK cells (18,44,49,50,52,62,67). In these cells, PrP^C was reported to be directed to the apical and/or basolateral membranes (18,44,49,50,52,62,67).

Recently, in a fully polarized MDCK cells, a basolateral to apical transcytosis was also reported for the full-length PrP^C and its fragments of cleavage (3). However, in highly polarized enterocytes PrP^C was found to be targeted to the lateral junctional complexes of adjacent cells and to interact with junctional proteins (3,62).

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

We used the human bronchial epithelial cells (16HBE14o-) as a model (21) to investigate the expression, localization, regulation and function of PrP^C in relation to oxidative stress and copper status. We demonstrated that PrP^C protein i) is expressed at the apical and basolateral sides ii) undergoes apical-to-basolateral transcytosis in fully polarized 16HBE14o- cells, iii) localizes and interacts with adherens junction proteins, vi) impacts cell-cell adhesion and cell junctions' integrity. More importantly, we demonstrated that PrP^C is involved in copper homeostasis and in the protection against the collapse of the bronchial epithelial barrier caused by oxidative stress.

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

Results

PrP^C expression and characterization in human bronchial epithelial cells

The expression of PrP^C protein was examined in human pulmonary epithelial cells. We used a well-established transformed bronchial epithelial cell line 16HBE-14o- (HBE) (16) that was kindly provided by Dr. D.C. Gruenert (University of California, CA) and A549, a human lung adenocarcinoma epithelial cell line. These cells are widely used as *in vitro* models to study type II pulmonary epithelial cells (ATCC, (23)). Both cell lines are able to grow as adherent

monolayer cells by developing cell-cell interactions through junctional complexes. However, only HBE cells are able to develop a progressive and high trans-epithelial resistance (TER). In our conditions, A549 reached a maximum TER-value of approximately $18 \Omega/\text{cm}^2$ after 9 days of culture, while HBE cells developed a TER of $\sim 650 \Omega/\text{cm}^2$ (Fig. S1-A). Comparable TER-values have been reported previously (22). These findings confirm that despite normal distribution of junctional barrier proteins in the both cell types, A549 cells are not able to develop comparable tightness to HBE cells. This makes HBE cells a good model to study the role of proteins that are involved in the development and the maintenance of intercellular junctions.

Using RT-PCR, we demonstrated that PrP^C gene is expressed in HBE and A549 cells (Fig. 1A). As control, we used N2a, mouse neuroblastoma cells commonly used to study PrP^C (24,41,56), and *HTR-8/SVneo cells*, a human anchoring trophoblast cell line, in which PrP^C expression has previously been characterized (2). PrP^C mRNA was highly expressed in HBE compared to A549 and N2a cells (Fig.1B). These results were confirmed by immunoblot assay (Fig. 1C). The anti-PrP antibodies recognized three different PrP^C forms in HTR, N2a, A549 and HBE cells. These forms correspond to the unglycosylated (~ 24 kDa), the immature glycosylated ($\sim 26-30$ kDa), and the mature highly glycosylated PrP^C ($\sim 31-37$ kDa) (Fig. 1C). The level of expression was evaluated using Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit as loading control. Similar results were obtained using a second loading control, the β -actin (Fig. S1-B).

At the cellular level, PrP^C maturation is characterized by its degree of glycosylation and by its expression at the plasma membrane (30). As previously described (18), the glycosylation of mature PrP^C was sensitive to N-glycosidase F (F) and insensitive to endoglycosidase H (H), indicating the expression of mature PrP^C in A549 and HBE cells (Fig.1D).

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

Human tissue and cellular localization of PrP^C

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

At the tissue level, PrP^C protein was mainly detected in cilia cells in which the localization appeared to be cytoplasmic and at the plasma membrane, mostly at the lateral and apical sides (Fig. 2A (c)). Low expression was observed in the connective tissue (Fig. 2A (c)). Incubation in the absence of the primary antibody (Fig. 2A (a)), or in the presence of the primary antibody (SAF32) that has been preincubated overnight with the immunogen peptide (Fig. 2A (b)) confirmed the specificity of PrP^C detection at the bronchial level.

For the cellular localization, we used immunofluorescence cell imaging and X/Z image reconstitution to analyze the distribution of PrP^C in exponentially growing (3 days of culture) or in polarized (10 days of culture) A549 and HBE cells. When A549 and HBE cells were used before the establishment of a cell-cell junction (3 days), PrP^C protein was detected at the apical, lateral and in the cytoplasmic domains (Fig. 2B and 2C). Interestingly, in confluent and polarized cells (10 days), only HBE cells that developed a high TER (Fig. S1-A) exhibited a unique lateral localization of PrP^C (Fig. 2D and 2E), while A549 cells, even after 10 days of culture, did not display any change in the PrP^C distribution, compared to those observed after 3 days of culture (Fig. 2B and 2C).

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

PrP^C colocalizes with key junctional proteins

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

However, no co-localization was found with ZO-1 protein, a member of the tight junctions (Fig. 3A and 3B). In A549 cells, PrP^C protein also co-localized with E-cadherin, γ -catenin, and desmoplakin (Fig. S1-C and S1-D).

Because it was reported that PrP^C protein could also be localized into the nucleus of intestinal cells (7), we searched for such localization in the HBE cells. Very light staining was observed in the nucleus of HBE cells, suggesting a possible nuclear localization of PrP^C protein in this cell type. To verify the existence of such localization, we performed a nucleus staining using DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), a fluorescent stain that binds strongly to DNA; anti-Ki-67, a nucleus resident protein that is associated with cell proliferation; and an anti-PrP^C antibody. Figure 3C shows that Ki-67 and DAPI co-localized in the nucleus. However, no staining and/or colocalization was found with the PrP^C protein (Fig. 3C), suggesting that the localization and the role of PrP^C in lung bronchial epithelial cells are restricted to the plasma membrane.

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

The co-localization results suggested that PrP^C protein might interact with junction-associated proteins. To verify this hypothesis, we immunoprecipitated PrP^C protein using an anti-PrP^C specific antibody (SAF-32). The targeted proteins were detected using western-blot analysis. We demonstrated that PrP^C does not interact with ZO-1 (Fig. 4A). However, PrP^C interacts with γ -catenin, E-cadherin, desmoplakin and desmoglein (Fig. 4A). To confirm the specificity of the antibody-antigen interaction, we used a non-specific antibody (mAb0) instead of the SAF-32 antibody to immunoprecipitate the PrP^C protein. The results reported in figure S2-A confirm the specificity of SAF-32 for the PrP^C protein. These results suggest the involvement of PrP^C in the establishment of the junctional complexes in the bronchial epithelial tissue.

To test this hypothesis, we knocked down PrP^C expression using siRNA strategy, and measured the TER and fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)-inulin transport. To invalidate the PrP^C expression in HBE cells, we tested two different siRNA labelled #1 and #2. Both siRNA knocked down PrP^C expression at mRNA and protein levels, as reported in figure S2-B-D. For the subsequent experiments using siRNA strategy, only siRNA#1 was used.

The TER was assessed during 8 days of culture to determine junction formation and strength (Fig. 4B). TER levels at days 8 of culture were plotted in figure 4C. As expected, TER increased in a time-dependent manner and reached a plateau after 8 days of culture ($\sim 620 \Omega \cdot \text{cm}^2$), which reflects the formation of cell-cell junctions (Fig. 4B and 4C). Interestingly, in PrP^C-knockdown HBE cells the TER levels were lower ($\sim 50\%$, $\sim 300 \Omega \cdot \text{cm}^2$) compared to the control condition (Fig. 4B and 4C). In addition to TER results, the evaluation of the transport of FITC-inulin demonstrate the increase of the paracellular permeability upon PrP^C knock down in HBE cells (Fig. 4D). Thus, the decrease in TER associated with enhanced permeability to inulin is an indicator of loss of bronchial epithelial barrier function.

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

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

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

PrP^C protein levels were quantified and normalized based on the levels of the alpha subunit of Na⁺/K⁺-ATPase (Fig. 5B). As shown in Fig. 5A, PrP^C was detected in untreated HBE cells as U-, I- and H-glycosylated forms. Following Cu stimulation, the three glycosylated forms gradually increased after 24h of treatment (Fig. 5A and 5B). Similar to PrP^C protein expression, the PrP^C mRNA levels were also significantly increased in response to Cu treatment (Fig. 5C and 5E), suggesting a transcriptional effect. Using a non-epithelial N2a cells, we observed that copper treatment also increased the expression of the three forms of PrP^C protein (Fig S3-A and B).

The high level of the H-glycosylated form of PrP^C observed following Cu treatment suggested an increase of PrP^C insertion into the plasma membrane. This hypothesis was confirmed by the cell surface biotinylation assay (Fig. 6A). Image analysis revealed that, compared to the control condition (absence of Cu), the abundance of biotinylated PrP^C

was increased ~25% following 24h of Cu-treatment (100 μ M), suggesting that the H-glycosylated form is almost totally inserted into the plasma membrane (Fig. 6B).

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

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

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

Immunohistochemistry analysis of lung tissues collected from control and copper treated mice showed that PrP^C was expressed in ciliated and basal cells in control mice (Fig. S3-B (b) and (c)). Following copper treatment, the PrP^C expression increased in bronchial tissues (Fig. S-B (c)). Altogether, these results suggest that there might be a strong relationship between the concentration of extracellular copper and the levels of PrP^C expression in the bronchial epithelial tissue.

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

Copper homeostasis is finely regulated and any disruption of its physiological concentrations causes an increase in the intracellular oxidative stress. The increase in PrP^C expression upon Cu treatment may reveal a stress protective response within the cell. To test the role of elevated PrP^C expression in preventing the Cu-induced cytotoxicity, we first measured the HBE cells viability using the MTT assay. After 24 h of incubation with the

indicated Cu concentrations, HBE cells exhibited a significant cell death of ~30% at 100 μM (Fig. 7A). Similar degree of cell death was observed at 200 μM (Fig. 7A).

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

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

Finally, using PrP-knockdown HBE cells we confirmed that PrP^C participates into the regulation of the intracellular Cu concentration (Fig. 7E). Using ICP-AES we found that Cu concentration in normal HBE was ~0.02 $\mu\text{g}/10^6$ cells (Fig. 7E). A slightly elevated copper levels (~0.03 $\mu\text{g}/10^6$ cell) were observed in PrP^C-silenced HBE cells (Fig. 7E). When Cu was added during 24h, the intracellular copper concentration was increased to ~0.8 $\mu\text{g}/10^6$ cell in wild type and to ~1.3 $\mu\text{g}/10^6$ cell in PrP^C-depleted HBE, respectively (Fig. 7E).

ROS-mediated increase of PrP^C in HBE cells

Based on the results reported in figures 5A and 7D, 24h of treatment with 100 μM of copper significantly increased PrP^C expression and the production of pro-oxidants molecules in HBE cells. These data suggested that PrP^C increased expression might in part be due to a primary increase in pro-oxidants molecules, such as hydrogen peroxide (H_2O_2). This hypothesis was tested by treating HBE cells for 24h with 100 μM of H_2O_2 in the absence or in the presence of 100 μM of Trolox, a hydrophilic analogue of vitamin E (Vit E) that acts as a free radicals scavenger (63).

First, we evaluated the ability of Vit E to reduce the intracellular level of ROS in HBE cells. As shown in figure 8A, treatment with H₂O₂ significantly increased the levels of ROS that were reduced in the presence of Vit E. Interestingly, the invalidation of PrP gene expression led to the collapse of the antioxidant protection provided by the PrP^C protein, as demonstrated by the elevated levels of ROS in the presence of H₂O₂ and by their reduction in the presence of the Vit E (Fig. 8A). To confirm our results, we performed an immunoblot using proteins extracts prepared from HBE cells treated for 24h either with copper (Cu), Vit E, H₂O₂, or Vit E plus H₂O₂ (H₂O₂+Vit E). Treatment with 50 μM of copper increased the expression of PrP^C protein. Similar results were observed upon treatment with H₂O₂, however, only the expression of the U- form was increased (Fig. 8B). The H- and I- forms appeared to slightly decrease compared to the control condition (Fig. 8B). Similar data were observed in neuronal cells and have been reported to result from PrP^C cleavage at the end of the copper-binding octapeptide repeats through the action of ROS, a process termed β-cleavage (71).

To further clarify the relationship between PrP^C expression and ROS production, we evaluated the effect of iron (Fe), a metal known to exhibit less affinity for PrP^C compare to copper and known to be a source of ROS production via the Fenton reaction (72). Treatment of HBE cells during 24h with the iron induced an increase in the expression of H- and I- PrP^C forms and to less extent the U-form (Fig. 8C). Altogether, these results demonstrate that PrP^C protein responds to oxidant aggressions independently of their origin.

Copper induced PrP^C expression is mainly transcriptional.

Since we showed that copper treatment increases the production of oxidative stress (Fig. 7D) and that ROS production increased PrP^C expression (Fig. 8B), we performed different experiments to evaluate the effect of copper associated oxidative stress on PrP^C expression. First, we demonstrated that Trolox treatment is able to reduce ROS levels, produced after treatment with copper (Fig 9A). Compared to the control condition (Fig. 9B), Trolox treatment did not affect the levels of PrP^C expression following copper treatment (Fig. 9 C), demonstrating that even in the absence of any oxidative stress, copper treatment still increases the levels of PrP^C protein expression. Similar results have been observed at the level of the mRNA, using Trolox (Fig. 9D). Our results demonstrate

that copper increases the expression of PrP^C through the Cu-associated oxidative stress but also through a transcriptional pathway. However, the latter is more predominant as previously reported in placental cells (2).

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

The functional effects of Cu on the permeability of the junctional barrier in polarized HBE cells were monitored by measuring TER values upon their treatment with 100 μM of Cu, from the apical side, for the indicated times. As shown in Fig. 10A, copper ions decreased TER values in a time-dependent manner, as evidenced by the decrease in TER values (~20%) (Fig. 10B). The levels of TER measured in the HBE cells treated with copper were compared to those obtained in PrP^C-knockdown HBE cells (Fig. 10B), at day 4 of confluence.

The results indicated that in HBE cells the decrease in PrP^C expression (siPrP^C) increased cell permeability (~50%) compared to Cu treatment (~18%). Our results suggest that the increase in PrP^C expression in the lateral side of bronchial epithelial cells (Fig. 6) protects the junctional barrier against the Cu-inducing oxidative stress that might affect the levels of expression of junctional protein, as was previously reported (20).

To test our hypothesis, we first evaluated the effect of copper treatment on the steady state expression of tight junctions (ZO-1, occluding (Occ)), adherents (γ-catenin (γ-Cat) and E-cadherin (E-Cad)) and desmosome (desmoplakin (Dep)) junctions. The results showed that in the presence of copper only ZO-1 expression decreased in a time-dependent manner (Fig. 10C). Neither γ-Cat/E-Cad nor desmoplakin proteins were affected by the copper treatment (Fig. 10C).

Subsequently, we assessed the stability of ZO-1 and occludin proteins using cycloheximide (CHX) assays in the absence or in the presence of copper. As reported in figure 10D the degradation of ZO-1 and occludin (Occ) were accelerated in the presence of copper.

Using PrP^C-knockdown HBE cells, we evaluated the role of PrP^C protein using cycloheximide (CHX) assays in the absence or in the presence of copper (Fig. 10E).

Since there was no co-localization, or interaction between PrP^C and ZO-1 protein (Fig. 3 and 4), we were not surprised to observe that the degradation rate of ZO-1 was not accelerated in PrP^C-knockdown HBE cells, in the absence or in the presence of copper (Fig. 10E). Unexpectedly, occludin degradation was accelerated under the same conditions,

suggesting that ZO-1 and occludin are differentially regulated by PrP^C and copper, although they belong to the same family of tight junctions. The degradation rate of desmoplakin (Dep) and desmoglein (Deg), proteins that interact with PrP^C, was significantly increased in PrP^C-knockdown HBE cells, particularly in the presence of copper (Fig. 10E). Similar results were obtained using a second siRNA (siPrP (#2)) (Fig. S4-B) compared to the control, using scrambled siRNA (Fig. S4-A).

These results demonstrate that by interacting and stabilizing the junctional proteins (adherens and desmosomes), PrP^C participates in the oxidative stress protection and in the maintenance of the bronchial epithelial junctional barrier.

Discussion

The present study is the first to demonstrate that PrP^C is expressed in the human bronchial epithelial cells, which form a physical barrier to inhaled toxic particles, bacteria and viruses (58). Using multiple approaches, we provide strong evidences for a novel role of the PrP^C protein in the protection of the bronchial epithelial barrier against potentially generated oxidative stress. The *in vivo* studies performed both in mice and human demonstrated that the PrP^C protein is highly expressed in the bronchial epithelial cells, comforting the search of its role in this epithelium.

Importantly, we demonstrate that PrP^C expression, glycosylation and digestion profiles detected in A549 and HBE cell lines were similar to those reported in intestinal epithelial cells (49), (50) and placental trophoblast cells (2). Moreover, the amount of PrP^C protein was 4 and 5 times higher in human HBE cells compared to human (SH-SY5Y) and mice (N2a) neuronal cells (data not shown), suggesting an important role for PrP^C in the bronchial epithelium function.

Compared to renal and intestinal MDCK and Caco-2 epithelial cells (18,49), HBE cells display also a high number of *PrP* gene copies and a high levels of PrP^C protein.

HTR, A549 and HBE cell lines mostly expressed PrP^C forms of lower electrophoretic mobility with apparent molecular weights between 30 and 37 kDa, compared to N2a cells that exhibit 26-30 kDa molecular weights for the PrP^C. Similar results were previously reported in N2a cells when compared to the rat B104 neuroblastoma, the mouse hypothalamic GT1-7, and the rat adrenal pheochromocytoma PC-12 cell lines (48). Monnet

et al (48) reported that in N2a cells the threshold of detection of the PrP^C was too low to evaluate the distribution of its multiple forms.

Although the molecular difference between the glycosylated forms in N2a and the other cells types is still to be elucidated, the deglycosylation results clearly showed that the 30-37 kDa PrP^C forms detected in HTR, A549 and HBE cells correspond to the PrP^C forms observed in N2a cells. The N-glycosylated forms of PrP^C might exhibit different glycan chains or derivatizations depending on the cell type. PrP^C deglycosylation in the different cell extracts including N2a cells (Fig. S4-C) indicated that the glycosylation processes were similar for all samples. The cellular prion protein glycosylation and expression levels may vary depending on the cell's density and/or state of differentiation, as previously reported for neuroblastoma B104 cells (48). Other possibility is that PrP^C protein may undergo proteolytic processing resulting in the production of different fragments as previously reported (40). In our study, copper-dependent β -cleavage is certainly taking place. The β -cleavage performed by radicals in a Fenton type reaction has been proposed to take place around the amino acid position, 90 of the PrP^C protein (40). In consequence of this cleavage, an N-terminal fragment of ~9 kDa (termed N2) is released whereas a corresponding C2 fragment of 18–20 kDa (depending on the glycosylation status) remains bound to the cellular membrane. To avoid the interference of this parameter with the interpretation of our results regarding the expression of the full length PrP^C protein under its different glycosylation states, we used the SAF-32 mAb that recognizes the whole octarepeated region of PrP^C spanning residues 51-98 (28).

To date, there is no consensus regarding the precise localization of the PrP^C in epithelia. Several groups, including ours, have proposed an apical localization of PrP^C in MDCK cells (13,18,59), which diverge from other studies showing a baso-lateral localization (62,67). These findings suggest that PrP^C localization is either controlled by the degree of epithelial cell polarization or that the PrP^C protein contributes to epithelial cell fusion and polarization. Such transcytosis trafficking has been recently observed in polarized epithelial MDCK cells (3).

PrP^C was detected in junctional complexes of the lateral membranes of adjacent polarized HBE cells where it was found to co-localize and interact with E-cadherin and desmoglein, and with their cytoplasmic partner, γ -catenin (plakoglobin) and desmoplakin. Interestingly,

no co-localization or interaction of PrP^C was reported with tight junction proteins. Similar results were described in enterocytes, where PrP^C was reported to be targeted to cell–cell junctional zone and to interact with several desmosomal (desmoglein-2, desmoplakin, γ -catenin), but not with adherens proteins (49). The absence of interaction with E-cadherin in enterocytes cells, even if a cellular co-localization was observed (49), suggested that in the bronchial epithelium such interactions might be important for the stability and the function of the junctional barrier.

In relation to the intracellular localization of PrP^C, it was reported that this protein could also be localized into the nucleus of intestinal cells (7). Based on the primary structure of the PrP protein and the site of its biosynthesis and maturation (64), the corresponding sialoglycoprotein is normally addressed to the plasma membrane where it can be released by phospholipase or protease treatments (64). Importantly, in the mouse scrapie-infected neuroblastoma cell line (ScN2a), immunocytochemical studies revealed that PrP^{Sc} and/or PrP^C are present, not only at the plasma membrane or in cytoplasmic compartments (12,43), but also in the nuclear compartment, particularly into the nucleolus (55).

According to its size (24 to 37 kDa), PrP^C is able to enter the nucleus either in an energy-dependent pathway if it possesses an NLS or by passive diffusion. Indeed, the analysis of the primary structure of the mature protein have revealed the existence of a nuclear localization sequence in N-terminal extremity (KKRPKP noted Pnls) (6,27). Through our experiments, we cannot conclude that PrP^C protein is localized into the nucleus of HBE cells. This statement is based on the co-immunofluorescence experiments that did not show any co-localisation between the PrP^C and Ki-67. Interestingly, as reported for trophoblast cells (2), the incubation of HBE cells with Cu increased PrP^C plasma membrane insertion, providing evidences for a potential role of PrP^C as a Cu sensor and/or chelator at the cell surface to protect these cells from Cu excess. However, in neurons, it has been reported that treatment with Cu increased PrP^C endocytosis (53), suggesting that the role of PrP^C protein in copper homeostasis is cell-dependent. Importantly, our *in vivo* approach substantiated the increase of PrP^C expression at the bronchial level, upon Cu intake by the mice. Because of the immediate endocytosis of PrP^C protein upon copper binding, one can speculate that prion protein could constitute a real copper transporter. In fact, once PrP^C binds extracellular copper on the cell surface and, when endocytosed and exposed to

lower pH of intracellular organelles, releases the metal ions. This hypothesis is very tempting, however multiple biochemical studies rather support the sensor role of PrP^C for copper and for other metals such as Zn²⁺ and Mn²⁺ (35,46,70).

The increase in PrP^C expression following Cu treatment caused a significant increase in the intracellular Cu concentration, along with an increase in ROS production. In addition, the loss of the expression of PrP^C protein, in the presence of Cu, caused dramatic effects on HBE viability and increased Cu content and ROS production. These finding highlights the stress protective role of PrP^C protein in bronchial epithelial cells and substantiate recent publish data reporting a stress protective role of PrP^C protein (60,73). We also confirm that PrP^C protein respond to other type of stress such as H₂O₂ and iron. Regarding iron, recent reports also indicated that PrP^C promotes cellular iron uptake by functioning as a ferrireductase (29). However, the metal transporter(s) involved in PrP^C-associated iron uptake and transport are not known. Human neuroblastoma cells (M17) that over-express PrP^C show resistance to higher amounts of ferric ammonium citrate (FAC) relative to non-transfected cells, suggesting a dose-dependent protection against redox-iron. One likely explanation for these observations is that interaction of redox-iron with copper and iron bound PrP initiates the Fenton reaction, resulting in denaturation and aggregation of PrP at the cell surface (17).

In addition, we demonstrated that even if PrP^C expression is increased during oxidative stress, under copper treatment, its levels of expression are mainly controlled through a transcriptional pathway.

However, the link between the role of PrP^C in bronchial epithelial barrier and its associated role against the oxidative stress is still to be demonstrate.

One of the consequences of chronic oxidative stress in the lung is the bronchial epithelial shedding and the breakdown of epithelium cohesion (4,5,36). Several reports in the literature have shown that damages caused by free radicals in epithelial cells are associated with an increase in the tight junction's permeability (4,5,61). We confirmed this finding in HBE cells and further demonstrate that these effects were ZO-1 and occluding dependent. Similar results have been reported in Caco-2 cells (19,20). The *PrP* gene invalidation in HBE cells caused a decrease in TER along with an increase in the instability

of tight and desmosomal protein junctions, highlighting the importance of PrP^C protein in oxidative protection of junctional proteins.

Through its interactions, PrP^C protein might ensure the stability and an oxidative stress protection for E-cadherin, γ -catenin, desmoplakin and desmoglein. The absence of such interactions might lead to the degradation of key junctional proteins, as was observed for ZO-1 and occludin. Previous studies, reported that in Caco-2 cells copper induced a concentration- and time-dependent decreases in the expression of tight junction proteins along with an increase in their permeability (19,20). These effects might be explained by the absence of interactions between PrP^C and E-cadherin, as previously reported in these cells (49).

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

Innovation:

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

Experimental Procedures

Human tissues collection

Peripheral human lung tissue (containing non cartilaginous airways) was obtained at the time of lung transplantation from non-smoking controls undergoing lung resection upon peripheral lung cancer (Grenoble Hospital). Lung tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin by inflation-immersion and embedded in paraffin. Collection and

processing of human lungs were conformed to the declaration of Helsinki and to all the rules of the local Committees on Human Research. Informed consent was obtained from each patient.

Mice tissues collection

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

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

Immunohistochemistry

5 µm paraffin-embedded sections were prepared from human non-smoking peripheral lung tissues. Immunohistochemistry was performed as described previously (2). Sections were incubated with anti-PrP antibody (SAF32, Bertin-Pharma, France). Immunopositive staining was detected using a Vectastain ABC kit (Vector Labs) using DAB (3, 3'-diaminobenzidine) as the chromagen (Vector Labs). Slides were counterstained using hematoxylin (Sigma Aldrich, France). Control sections were treated with either the secondary antibody alone or with the anti-PrP^C antibody (SAF-32) that has been preabsorbed overnight at 4°C with the appropriate antigen peptide (Covalab company, Lyon, France).

Immunohistochemistry was also performed on lung sections collected from C57 mice as described previously (2).

Cell culture

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

This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

Antioxidants and Redox Signaling

Involvement of the Prion Protein in the Protection of the Human Bronchial Epithelial Barrier against Oxidative Stress (DOI: 10.1089/ars.2018.7500)

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

siRNA knockdown of PrP^C and Transfection

The silencing PrP^C expression essay was performed following the protocol described in a previous report (32). The experiments where the expression of *PrP* gene was invalidated using siRNA strategy were performed in parallel of controlled experiments using scrambled siRNA. The presence of the transfectant reagent (*Lipofectamine*[®] 2000, France) and siRNA scramble did not affect the cell viability compared to the control (untreated) condition. The results are reported as supplementary data (Fig. S4-D).

Cells lysates

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

Endoglycosidase and proteinase K (PK) digestion

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

Immunoprecipitation, electrophoresis and immunoblotting

For immunoprecipitation assay, cells were lysed at 4°C for 30 min in PBS lysis solution containing 20 mM Tris HCl pH 8, 137 mM NaCl, 10% glycerol and 1% Nonidet P-40 (NP-40). Protein extracts were incubated 2 h with 1 μg/ml of anti-PrP^C antibody (SAF32) at 4°C, and immunoprecipitated with protein G-coupled sepharose beads (Sigma) for 2 h hours at 4°C.

All protein samples were denatured for 5 min at 90°C in 2.5% SDS final concentration of Laemmli Sample Buffer (LBS), subjected to an SDS-PAGE (12%), transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad) and probed with corresponding primary antibodies. The following antibodies were used: mouse anti-E-cadherin (Ecad, Ozyme, France), anti-desmoglein (Deg, Covalab, France), anti-Ki-67 (DAKO, France), anti-Na⁺/K⁺-ATPase (Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa), and rabbit anti-ZO-1 (Fisher Sc., France), anti- γ -catenin (γ -cat, Abcam), anti-occludin (Occ, Sigma, France), anti-desmoplakin (Dep, Covalab, France). The antigen-antibody reaction was revealed using IgG antibody coupled to HRP (Covalab, France) and developed with ECL (Bio-Rad, France) using Fusion FX7 (Vilbert Lourmat).

Cell surface biotinylation

To determine the cell surface expression of PrP^C protein, HBE cells were selectively biotinylated as described previously (18). Biotinylated PrP^C protein was isolated by immunoprecipitation on Streptavidin-Sepharose (Sigma-Aldrich) and visualized by immunoblotting using anti-PrP mAb. The amount of biotinylated PrP^C relative to the control (time (t) = 0) was quantified by scanning the gel lanes followed by analysis with the Scion Image program (<http://www.scioncorp.com/pages>).

Immunofluorescence microscopy

The indirect immunofluorescence has been done as described previously (18).

RNA isolation, RT, and real-time qPCR analysis

Total mRNA was extracted from cells and 1 μ g of the mRNA was reverse transcribed under conditions recommended by the manufacturer (Agilent technologies). The PCR was performed using the mouse (forward: 5'GTGTACTACAGGAAAGTGGATC3'; backward: 5'ACGACTGCGTCAATATCACCAT3') and human (forward: 5'CAAGCCGAGTAAGCCAAAACC3'; backward: 5'CCCATCATACATTCGGCAGTG) 3' primers and GoTaq[®] qPCR Master Mix provided by Promega. The primers were designed to amplify a 131 pb fragment of the human *PrP* gene in HTR, A549 and HBE cells and a 69 pb fragment of the mouse *PrP* gene in the N2a cells.

Prion mRNA expression was quantified by real-time RT-qPCR using CFX96[™] Real-Time detection system (Biorad) as previously described (66).

Cell viability using MTT test

Cells were cultured in 96 wells plate upon confluency. Depending on experiment, 0-200 μM CuSO_4 was added for 0-24 hours and followed by 4 h incubation in phenol red free medium containing 10% of MTT ([4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma). The MTT solution was replaced by MTT lysis solution (10% Triton X-100 and 0.1 N HCl in anhydrous isopropanol), and the resulting optical density (DO) was determined after measurement of the difference between 570 nm and 690 nm absorbance.

Trans-epithelial resistance (TER) assay

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

Paracellular Permeability measurement

The rate of inulin diffusion across the HBE cell layer was measured 48h after transfection with siRNA-PrP^C or scrambled (control). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled inulin (Sigma, France) was dissolved in HBE cells medium at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and was introduced to the apical side of the cells. After 24 h incubation at 37°C, the media on the apical and basolateral side of the cells were collected. The concentration of FITC-inulin in the collected medium was measured using a fluorescent plate reader (TECAN, France) with 475 nm excitation and 500–550 nm emission. The apparent permeability was calculated as previously reported (15).

Intracellular copper determination

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

ROS Measurements

Normal and PrP^C siRNA knockdown HBE cells (10^6 cells/well) were seeded in a 24-well plate and cultured for 24 h. The cells were washed and changed to serum-free media and incubated with 50 μM of 5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein

diacetate acetyl ester (H₂DCFDA, Invitrogen, France) for 45 min. The conversion of H₂DCFDA to fluorescent DCF was measured using a plate reader Infinite M200 (TECAN, France).

Statistical analysis

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

Acknowledgments

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

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

Author Disclosure Statement

There is no conflict of interest.

References

1. Aguzzi A, Baumann F, Bremer J. The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* 31: 439-77, 2008.
2. Alfaidy N, Chauvet S, Donadio-Andrei S, Salomon A, Saoudi Y, Richaud P, Aude-Garcia C, Hoffmann P, Andrieux A, Moulis JM, Feige JJ, Benharouga M. Prion protein expression and functional importance in developmental angiogenesis: role in oxidative stress and copper homeostasis. *Antioxid Redox Signal* 18: 400-11, 2013.
3. Arkhipenko A, Syan S, Victoria GS, Lebreton S, Zurzolo C. PrPC Undergoes Basal to Apical Transcytosis in Polarized Epithelial MDCK Cells. *PLoS One* 11: e0157991, 2016.
4. Baker RD, Baker SS, LaRosa K. Polarized Caco-2 cells. Effect of reactive oxygen metabolites on enterocyte barrier function. *Dig Dis Sci* 40: 510-8, 1995.
5. Banan A, Fields JZ, Zhang Y, Keshavarzian A. iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G1234-46, 2001.
6. Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46: 417-28, 1986.
7. Besnier LS, Cardot P, Da Rocha B, Simon A, Loew D, Klein C, Riveau B, Lacasa M, Clair C, Rousset M, Thenet S. The cellular prion protein PrPc is a partner of the Wnt pathway in intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell* 26: 3313-28, 2015.
8. Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretschmar H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390: 684-7, 1997.
9. Buschmann A, Kuczius T, Bodemer W, Groschup MH. Cellular prion proteins of mammalian species display an intrinsic partial proteinase K resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 693-702, 1998.
10. Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros* 14: 419-30, 2015.
11. Castle AR, Gill AC. Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Front Mol Biosci* 4: 19, 2017.

12. Caughey B, Neary K, Buller R, Ernst D, Perry LL, Chesebro B, Race RE. Normal and scrapie-associated forms of prion protein differ in their sensitivities to phospholipase and proteases in intact neuroblastoma cells. *J Virol* 64: 1093-101, 1990.
13. Christensen HM, Harris DA. A deleted prion protein that is neurotoxic in vivo is localized normally in cultured cells. *J Neurochem* 108: 44-56, 2009.
14. Collinge J. Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Human Molecular Genetics* 6: 1699-1705, 1997.
15. Coyne CB, Vanhook MK, Gambling TM, Carson JL, Boucher RC, Johnson LG. Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol Biol Cell* 13: 3218-34, 2002.
16. Cozens AL, Yezzi MJ, Yamaya M, Steiger D, Wagner JA, Garber SS, Chin L, Simon EM, Cutting GR, Gardner P. A transformed human epithelial cell line that retains tight junctions post crisis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Journal of the Tissue Culture Association* 28A: 735-744, 1992.
17. Das D, Luo X, Singh A, Gu Y, Ghosh S, Mukhopadhyay CK, Chen SG, Sy MS, Kong Q, Singh N. Paradoxical role of prion protein aggregates in redox-iron induced toxicity. *PLoS One* 5: e11420, 2010.
18. De Keukeleire B, Donadio S, Micoud J, Lechardeur D, Benharouga M. Human cellular prion protein hPrPC is sorted to the apical membrane of epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354: 949-954, 2007.
19. Ferruzza S, Scacchi M, Scarino ML, Sambuy Y. Iron and copper alter tight junction permeability in human intestinal Caco-2 cells by distinct mechanisms. *Toxicol In Vitro* 16: 399-404, 2002.
20. Ferruzza S, Scarino ML, Rotilio G, Ciriolo MR, Santaroni P, Muda AO, Sambuy Y. Copper treatment alters the permeability of tight junctions in cultured human intestinal Caco-2 cells. *Am J Physiol* 277: G1138-48, 1999.
21. Forbes B, Shah A, Martin GP, Lansley AB. The human bronchial epithelial cell line 16HBE14o-as a model system of the airways for studying drug transport. *International Journal of Pharmaceutics* 257: 161-167, 2003.

22. Geys J, Coenegrachts L, Vercammen J, Engelborghs Y, Nemmar A, Nemery B, Hoet PH. In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles: a preliminary study. *Toxicol Lett* 160: 218-26, 2006.
23. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51: 1417-23, 1973.
24. Gomes MP, Millen TA, Ferreira PS, e Silva NL, Vieira TC, Almeida MS, Silva JL, Cordeiro Y. Prion protein complexed to N2a cellular RNAs through its N-terminal domain forms aggregates and is toxic to murine neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 283: 19616-25, 2008.
25. Gonzalez-Mariscal L, Namorado MC, Martin D, Luna J, Alarcon L, Islas S, Valencia L, Muriel P, Ponce L, Reyes JL. Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. *Kidney Int* 57: 2386-402, 2000.
26. Grumbach Y, Quynh NV, Chiron R, Urbach V. LXA4 stimulates ZO-1 expression and transepithelial electrical resistance in human airway epithelial (16HBE14o-) cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L101-8, 2009.
27. Gu Y, Hinnerwisch J, Fredricks R, Kalepu S, Mishra RS, Singh N. Identification of cryptic nuclear localization signals in the prion protein. *Neurobiol Dis* 12: 133-49, 2003.
28. Haeberle AM, Ribaut-Barassin C, Bombarde G, Mariani J, Hunsmann G, Grassi J, Bailly Y. Synaptic prion protein immuno-reactivity in the rodent cerebellum. *Microsc Res Tech* 50: 66-75, 2000.
29. Haldar S, Tripathi A, Qian J, Beserra A, Suda S, McElwee M, Turner J, Hopfer U, Singh N. Prion protein promotes kidney iron uptake via its ferrireductase activity. *J Biol Chem* 290: 5512-22, 2015.
30. Harris DA. Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev* 12: 429-44, 1999.
31. Hiemstra PS, McCray PB, Jr., Bals R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur Respir J* 45: 1150-62, 2015.
32. Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal J-P, Mazouni C, Feige J-J, Alfaidy N. Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13: 2224-2235, 2009.

33. Hu W, Kieseier B, Frohman E, Eagar TN, Rosenberg RN, Hartung HP, Stuve O. Prion proteins: physiological functions and role in neurological disorders. *J Neurol Sci* 264: 1-8, 2008.
34. Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* 19: 4687-93, 2008.
35. Jackson GS, Murray I, Hosszu LL, Gibbs N, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8531-5, 2001.
36. John LJ, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxid Redox Signal* 15: 1255-70, 2011.
37. Johnson LN, Koval M. Cross-talk between pulmonary injury, oxidant stress, and gap junctional communication. *Antioxid Redox Signal* 11: 355-67, 2009.
38. Khosravani H, Zhang Y, Tsutsui S, Hameed S, Altier C, Hamid J, Chen L, Villemaire M, Ali Z, Jirik FR, Zamponi GW. Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Cell Biol* 181: 551-65, 2008.
39. Kohler K, Louvard D, Zahraoui A. Rab13 regulates PKA signaling during tight junction assembly. *J Cell Biol* 165: 175-80, 2004.
40. Linsenmeier L, Altmeppen HC, Wetzel S, Mohammadi B, Saftig P, Glatzel M. Diverse functions of the prion protein - Does proteolytic processing hold the key? *Biochim Biophys Acta* 1864: 2128-2137, 2017.
41. Llorens F, Ansoleaga B, Garcia-Esparcia P, Zafar S, Grau-Rivera O, Lopez-Gonzalez I, Blanco R, Carmona M, Yague J, Nos C, Del Rio JA, Gelpi E, Zerr I, Ferrer I. PrP mRNA and protein expression in brain and PrP(c) in CSF in Creutzfeldt-Jakob disease MM1 and VV2. *Prion* 7: 383-93, 2013.
42. MacNee W, Rahman I. Oxidants/antioxidants in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 50 Suppl 1: S53-8, 1995.
43. McKinley MP, Taraboulos A, Kenaga L, Serban D, Stieber A, DeArmond SJ, Prusiner SB, Gonatas N. Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab Invest* 65: 622-30, 1991.

44. Mishra RS, Basu S, Gu Y, Luo X, Zou W-Q, Mishra R, Li R, Chen SG, Gambetti P, Fujioka H, Singh N. Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24: 11280-11290, 2004.
45. Mittal M, Thiruvengkatachari B, Sandler PJ, Benson PE. A three-dimensional comparison of torque achieved with a preadjusted edgewise appliance using a Roth or MBT prescription. *Angle Orthod* 85: 292-7, 2015.
46. Miura T, Hori-i A, Mototani H, Takeuchi H. Raman spectroscopic study on the copper(II) binding mode of prion octapeptide and its pH dependence. *Biochemistry* 38: 11560-9, 1999.
47. Mo GW, Cai SX, Zhao HJ, Li WJ, Tong WC, Liu LY. [Effect of toluene diisocyanate on reactive oxygen species production and permeability of human bronchial epithelial cells in vitro]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 31: 239-43, 2011.
48. Monnet C, Marthiens V, Enslin H, Frobert Y, Sobel A, Mege RM. Heterogeneity and regulation of cellular prion protein glycoforms in neuronal cell lines. *Eur J Neurosci* 18: 542-8, 2003.
49. Morel E, Fouquet S, Chateau D, Yvernault L, Frobert Y, Pinçon-Raymond M, Chambaz J, Pillot T, Rousset M. The cellular prion protein PrPc is expressed in human enterocytes in cell-cell junctional domains. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 1499-1505, 2004.
50. Morel E, Fouquet S, Strup-Perrot C, Thievend CP, Petit C, Loew D, Faussat A-M, Yvernault L, Pinçon-Raymond M, Chambaz J, Rousset M, Thenet S, Clair C. The Cellular Prion Protein PrPc Is Involved in the Proliferation of Epithelial Cells and in the Distribution of Junction-Associated Proteins. *PLoS ONE* 3: e3000, 2008.
51. Nawijn MC, Hackett TL, Postma DS, van Oosterhout AJ, Heijink IH. E-cadherin: gatekeeper of airway mucosa and allergic sensitization. *Trends Immunol* 32: 248-55, 2011.
52. Paquet S, Sabuncu E, Delaunay J-L, Laude H, Vilette D. Prion Infection of Epithelial Rov Cells Is a Polarized Event. *Journal of Virology* 78: 7148-7152, 2004.
53. Pauly PC, Harris DA. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* 273: 33107-10, 1998.

54. Petit CS, Besnier L, Morel E, Rousset M, Thenet S. Roles of the cellular prion protein in the regulation of cell-cell junctions and barrier function. *Tissue Barriers* 1: e24377, 2013.
55. Pfeifer K, Bachmann M, Schroder HC, Forrest J, Muller WE. Kinetics of expression of prion protein in uninfected and scrapie-infected N2a mouse neuroblastoma cells. *Cell Biochem Funct* 11: 1-11, 1993.
56. Provansal M, Roche S, Pastore M, Casanova D, Belondrade M, Alais S, Leblanc P, Windl O, Lehmann S. Proteomic consequences of expression and pathological conversion of the prion protein in inducible neuroblastoma N2a cells. *Prion* 4: 292-301, 2010.
57. Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252: 1515-22, 1991.
58. Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C. Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 3: 726-33, 2006.
59. Puig B, Altmepfen HC, Thurm D, Geissen M, Conrad C, Bräulke T, Glatzel M. N-glycans and glycosylphosphatidylinositol-anchor act on polarized sorting of mouse PrP(C) in Madin-Darby canine kidney cells. *PLoS One* 6: e24624, 2011.
60. Rachidi W, Vilette D, Guiraud P, Arlotto M, Riondel J, Laude H, Lehmann S, Favier A. Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery. *J Biol Chem* 278: 9064-72, 2003.
61. Rao RK, Baker RD, Baker SS, Gupta A, Holycross M. Oxidant-induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol* 273: G812-23, 1997.
62. Sarnataro D, Paladino S, Campana V, Grassi J, Nitsch L, Zurzolo C. PrPC is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts. *Traffic* 3: 810-21, 2002.
63. Sauer H, Wefer K, Vetrugno V, Pocchiari M, Gissel C, Sachinidis A, Hescheler J, Wartenberg M. Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and TNF-alpha: the role of intracellular reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 35: 586-94, 2003.
64. Stahl N, Borchelt DR, Prusiner SB. Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochemistry* 29: 5405-12, 1990.

65. Sussan TE, Gajghate S, Chatterjee S, Mandke P, McCormick S, Sudini K, Kumar S, Breyse PN, Diette GB, Sidhaye VK, Biswal S. Nrf2 reduces allergic asthma in mice through enhanced airway epithelial cytoprotective function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309: L27-36, 2015.
66. Traboulsi W, Sergent F, Boufettal H, Brouillet S, Slim R, Hoffmann P, Benlahfid M, Zhou QY, Balboni G, Onnis V, Bolze PA, Salomon A, Sauthier P, Mallet F, Aboussaouira T, Feige JJ, Benharouga M, Alfaidy N. Antagonism of EG-VEGF Receptors as Targeted Therapy for Choriocarcinoma Progression In Vitro and In Vivo. *Clin Cancer Res* 23: 7130-7140, 2017.
67. Uelhoff A, Tatzelt J, Aguzzi A, Winklhofer KF, Haass C. A pathogenic PrP mutation and doppel interfere with polarized sorting of the prion protein. *J Biol Chem* 280: 5137-40, 2005.
68. Villegas L, Stidham T, Nozik-Grayck E. Oxidative Stress and Therapeutic Development in Lung Diseases. *J Pulm Respir Med* 4, 2014.
69. Vivekananda J, Lin A, Coalson JJ, King RJ. Acute inflammatory injury in the lung precipitated by oxidant stress induces fibroblasts to synthesize and release transforming growth factor- α . *J Biol Chem* 269: 25057-61, 1994.
70. Waggoner DJ, Drisaldi B, Bartnikas TB, Casareno RL, Prohaska JR, Gitlin JD, Harris DA. Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J Biol Chem* 275: 7455-8, 2000.
71. Watt NT, Taylor DR, Gillott A, Thomas DA, Perera WS, Hooper NM. Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *J Biol Chem* 280: 35914-21, 2005.
72. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* 82-83: 969-74, 1995.
73. Zeng F, Watt NT, Walmsley AR, Hooper NM. Tethering the N-terminus of the prion protein compromises the cellular response to oxidative stress. *J Neurochem* 84: 480-90, 2003.

List of Abbreviations

Cu: Copper

DCF: dichlorofluorescein

16HBE14o- (HBE): Human Bronchial Epithelial cells

GPI: Glycosyl Phosphatidyl Inositol

CF: Cystic fibrosis

PrP^C: Cellular Prion Protein

ROS: Reactive Oxygen Species

Figure legends

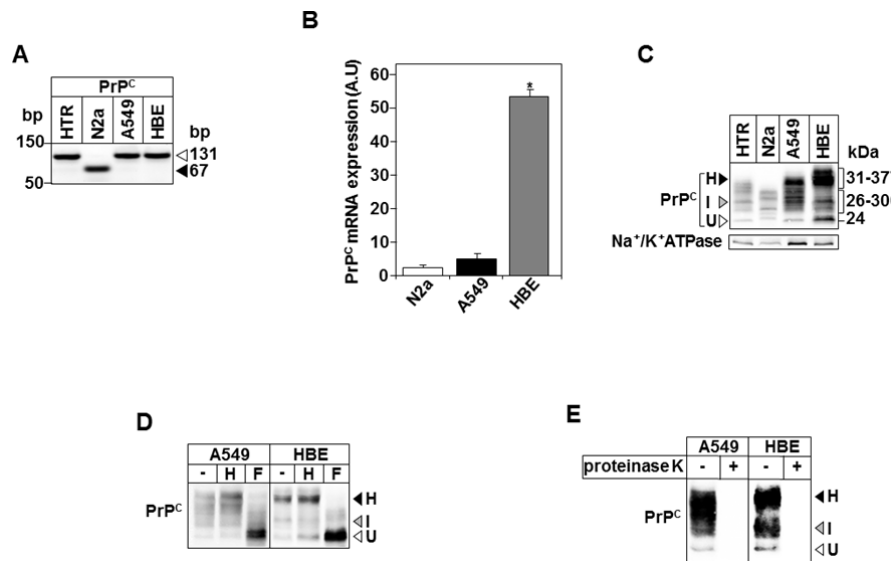


Figure 1: Steady state expression and characterization of PrP^C protein in human bronchial epithelial cells (HBE). **(A)** RT-qPCR of PrP^C mRNA in HTR, N2a, A549 and HBE cells. **(B)** The expression levels of PrP^C mRNAs were quantified by real-time RT-qPCR, normalized to the 18S levels. Data are expressed as mean ± SE (n=4). **(C)** Immunoblot detection of PrP^C in protein extracts from N2a, HTR, A549 and HBE cells. **(D)** Endoglycosidase H (H) and N-glycosidase F (F) digestion profiles of PrP^C protein. **(E)** PrP^C digestion with 20 µg/ml of proteinase K (PK) for 1 hour at 37°C. **(C, D, E)** Equal amounts of protein extracts from the indicated cell lines were separated on 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted using the monoclonal anti-PrP antibody (SAF-32). The high- (H), intermediate- (I), and unglycosylated (U) forms are indicated, respectively, by black, gray, and white arrowheads.

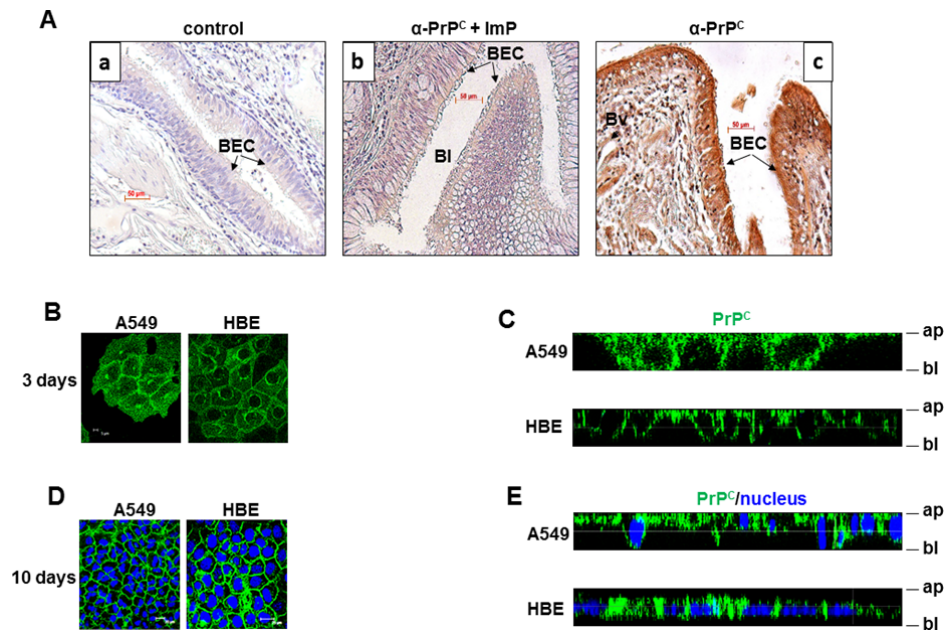


Figure 2: Localization of PrP^C protein in human bronchial epithelial tissue and cells. **(A)** Immunolocalization of PrP^C using mAb anti-PrP (SAF-32) in human bronchial tissue (c). (a) and (b) correspond to the negative controls using the secondary antibody alone (a) or the SAF-32 mAb preincubated (ImP) for 24h at 4°C with the corresponding antigenic peptide (b). Asterisks in panels (b) show the strongest sites of PrP^C immunoreactivity. Bl, bronchial lumen, BEC, bronchial epithelial cells. **(B-E)** Immunofluorescence labeling of PrP^C (green, MAb anti-PrP) and nuclei (bleu, Hoechst) was performed after 3 or 10 days of HBE culture, **(C and E)** X/Z projections were reconstructed from horizontal optical sections of labeled cells at 3 and 10 days of confluency. ap, apical, bl, basolateral (n=4).

“To see this illustration in color, the reader is referred to the online version of this article at www.liebertpub.com/ars”

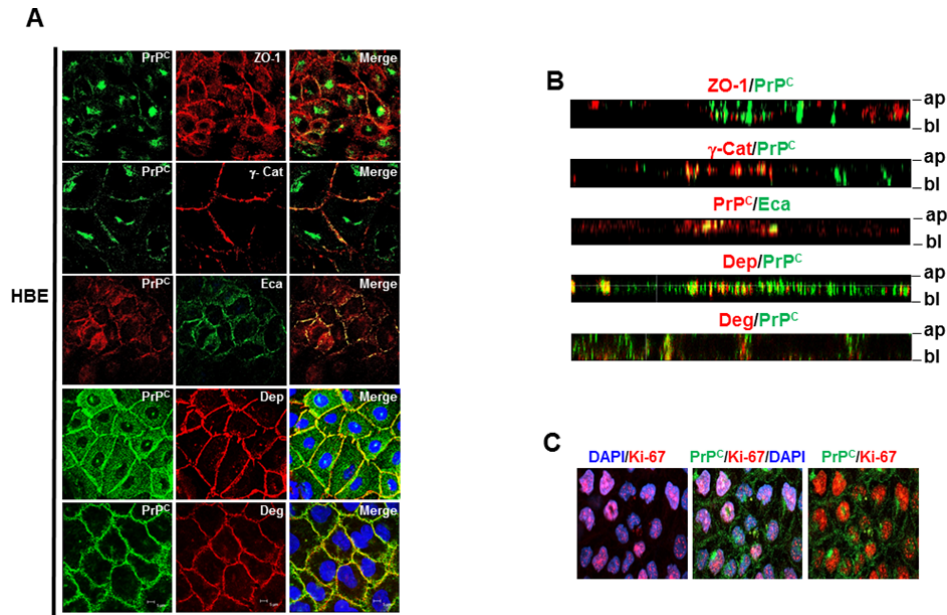


Figure 3: Colocalization of PrP^C protein with different proteins of the junctional barrier in polarized HBE cells. **(A)** Co-immunofluorescence labeling of PrP^C, zona occludens-1 (ZO-1), γ -catenin (γ -Cat), E-cadherin (Eca), desmoplakin (Dep), desmoglein (Des) and nuclei (blue, Hoechst) was performed in polarized HBE cells at day 10 of culture. **(B)** X/Z projections were reconstructed from horizontal optical section of labeled HBE cells at 10 days confluency. ap, apical, bl, basolateral. **(C)** Co-immunofluorescence labeling of PrP^C, Ki-67 protein and nuclei (blue, Hoechst) was performed in polarized HBE cells at day 10 of culture (n=4).

"To see this illustration in color, the reader is referred to the online version of this article at www.liebertpub.com/ars"

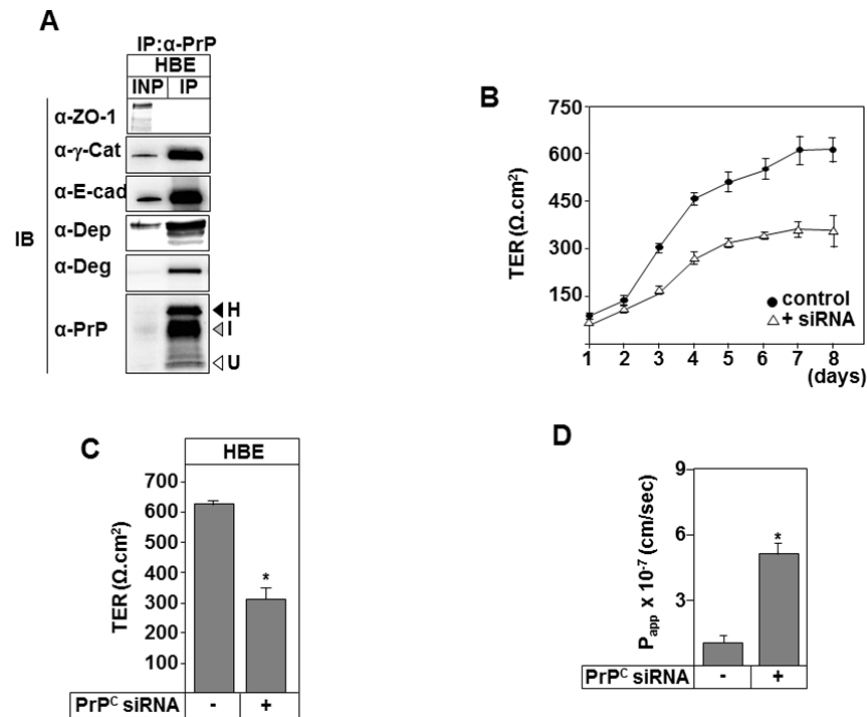


Figure 4: Interaction profiles and role of PrP^C protein in bronchial epithelial barrier. **(A)** PrP^C was immunoprecipitated (IP) using anti-PrP mAb (SAF32) and protein G coupled to sepharose. The eluted proteins were subjected to immunoblots (IB) using anti-PrP, anti-ZO-1, anti-γ-Cat (γ-Catenin) anti-Ecad (E-cadherin), anti-desmoplakin (Dsp) or anti-desmoglein (Deg). IN: input (10% of the protein extract before immunoprecipitation). The high- (H), intermediate- (I), and unglycosylated (U) forms are indicated, respectively, by black, gray, and white arrowheads. **(B)** Trans-epithelial resistance (TER) measurement in control (si-Scramble ●) and PrP^C-knockdown HBE cells (Δ). Cells were seeded at confluency (day 0) on collagen-coated polycarbonate filters and TER was assessed daily for 8 days. **(C)** TER values measured after 8 days of culture were plotted for the control (-) and PrP^C-knockdown (+) HBE cells. Values overwritten with stars are significantly different from the control ($p < 0.05$, $n=4$). **(D)** Paracellular permeability of HBE cells. FITC labeled-inulin was added to the apical chamber of si-Scramble (-) or PrP^C-knockdown HBE cells. Following 24h incubation at 37°C, the basolateral medium was removed for fluorescence measurement, and P_{app} (permeability apparent) was calculated. Results represent the mean of four independent experiments carried out in triplicate; bars represent the mean \pm SE ($P < 0.05$).

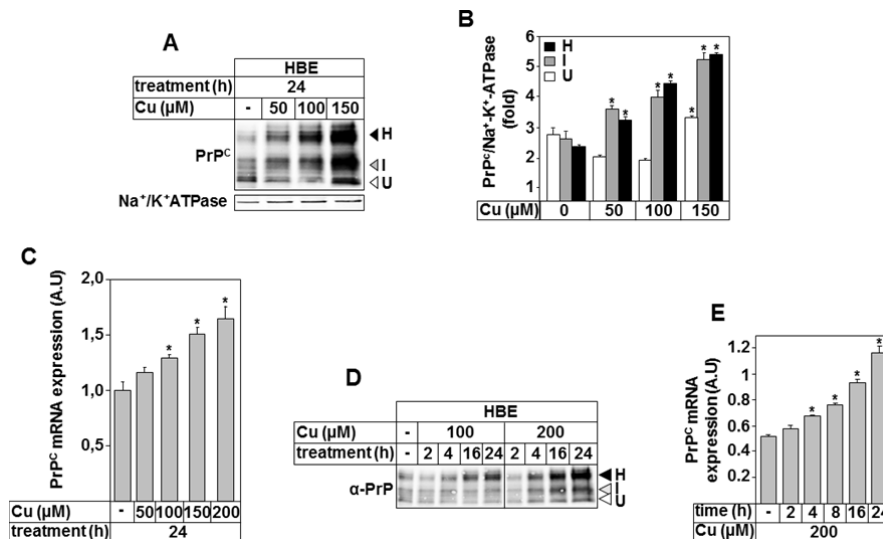


Figure 5: Copper treatment increases PrP^C expression in HBE cells. **(A, D)** HBE cells were treated with copper sulfate in a dose (μM) and time (h) dependent manner and cell lysates were subjected to immunoblots using anti-PrP (SAF-32) or anti-Na⁺/K⁺-ATPase antibody. The high- (H), intermediate- (I), and unglycosylated (U) forms are indicated, respectively, by black, white, and gray arrowheads. **(B)** ImageJ quantification of the expression of the three glycosylation forms of PrP^C protein standardized to Na⁺/K⁺-ATPase expression in HBE cells. **(C, E)** Following copper treatment, PrP^C mRNAs expression levels were quantified by real-time RT-PCR, normalized to the 18S levels and plotted as function of incubation time (h) and concentration (μM). A.U: arbitrary unit. Data are expressed as mean ± SE (n=6). Values overwritten with stars are significantly different from the control (0 h) (P < 0.05).

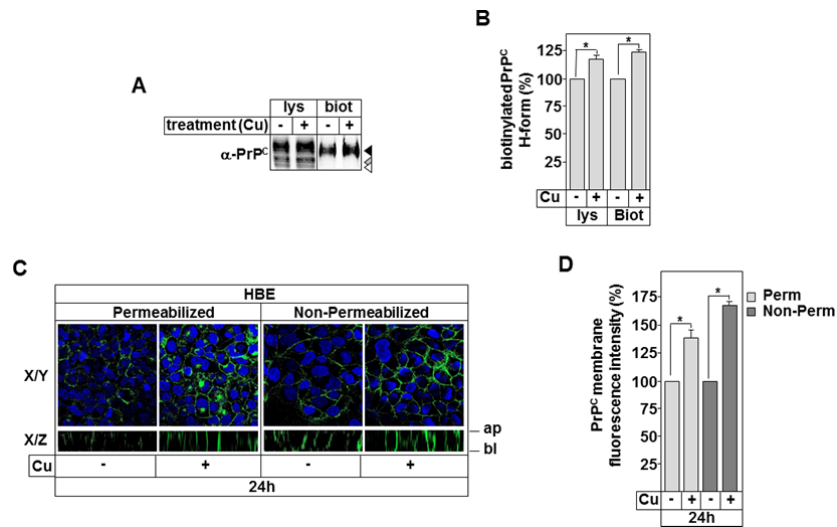


Figure 6: Copper treatment stimulates lateral membrane insertion of PrP^C protein.

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

“To see this illustration in color, the reader is referred to the online version of this article at www.liebertpub.com/ars”

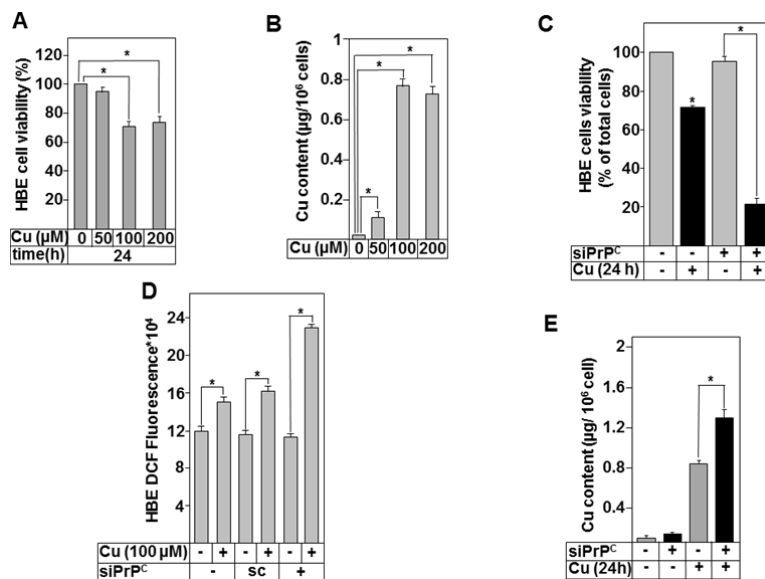


Figure 7: Depletion of PrP^C in HBE cells enhances Cu-induced pro-oxidants accumulation, increases cell Cu content and causes acute cell death. (**A, C**) Control (si-Scramble) or PrP-knockdown HBE cells (siPrP^C) were incubated in the absence or the presence of Cu for the indicated times. Cells were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

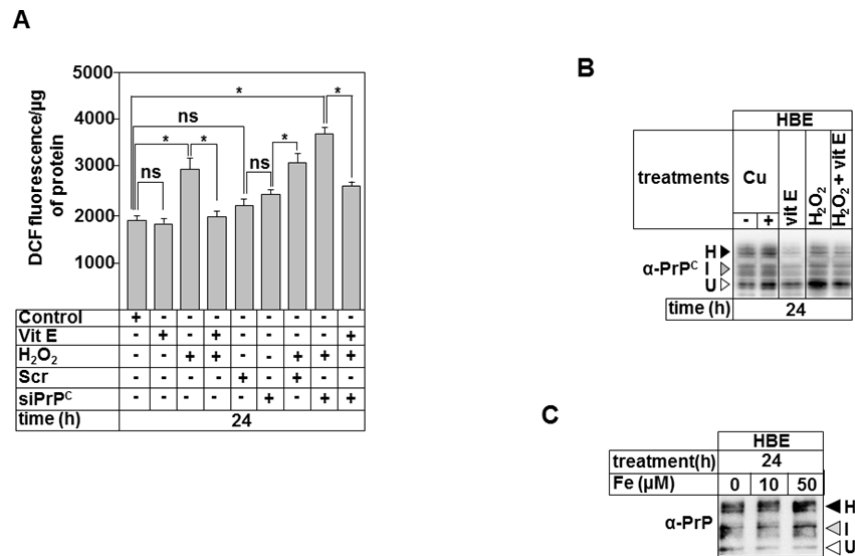


Figure 8: PrP^C protein responds to other pro-oxidants stimuli. (A) Control, si-Scramble (Scr), or PrP-knockdown HBE cells (siPrP^C) were cultured for 24h in the absence or in the presence of 100 μM of Trolox (vitamin E; Vit E), 100 μM of H₂O₂, or in the presence of both molecules. Oxidative stress evaluation was achieved by incubating the cells with 50 μM of DCFH-DA for 45 min. DCF fluorescence was determined at an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 538 nm by a microplate reader. Data are expressed as mean ± SE (n=4). Values with an asterisk are significantly different from the corresponding control (P < 0.05). (B) Detection of PrP^C protein in HBE cells extract following 24h treatment with 50 μM of copper (Cu), 100 μM of Vit E, 100 μM of H₂O₂ or a combination of Vit E and H₂O₂. PrP^C was immunoblotted with anti-PrP mAb (SAF-32). (C) HBE cells were treated with iron sulfate in a dose (μM) dependent manner and cell lysates were subjected to immunoblots using anti-PrP (SAF-32) or anti-Na⁺/K⁺-ATPase antibody. The high- (H), intermediate- (I), and unglycosylated (U) forms are indicated, respectively, by black, white, and gray arrowheads.

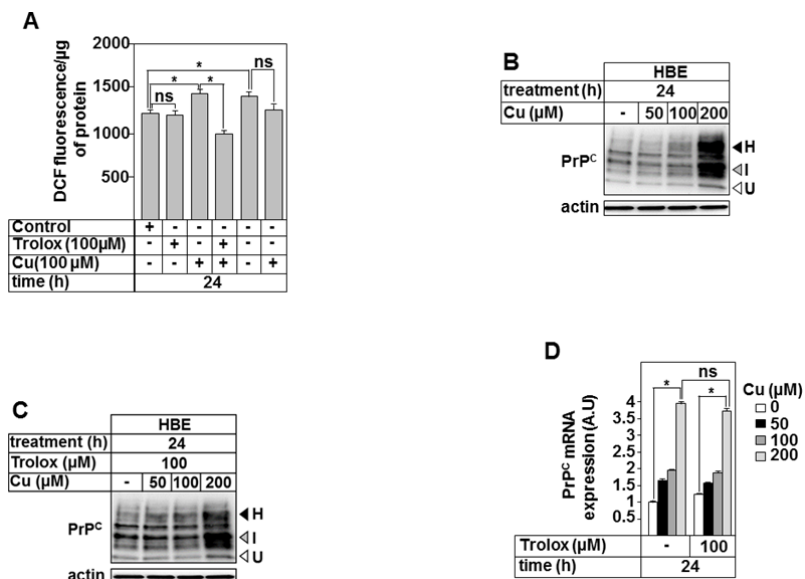


Figure 9: Copper increases PrP^C protein expression via a transcriptional pathway.

(A) HBE cells were cultured for 24h in the absence or in the presence of 100 μM of Trolox (vitamin E; Vit E), 100 μM of Cu, or in the presence of both molecules. Oxidative stress evaluation was achieved as described in figure 8A. Data are expressed as mean ± SE (n=4). Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls (P < 0.05). (B and C) report the detection of PrP^C protein in HBE cells extracts following 24h treatment with different concentrations of copper; Cu alone (B) or in combination with 100 μM of Trolox (C). (D) reports PrP^C mRNAs expression levels following 24h treatment with different concentrations of copper (Cu) alone or with 100 μM of Trolox. PrP^C mRNAs expression were quantified by real-time RT-PCR, normalized to the 18S levels and plotted as function of concentration of copper (μM). A.U: arbitrary unit. Data are expressed as mean ± SE (n=6). Values overwritten with stars are significantly different from the control (0 h) (P < 0.05).

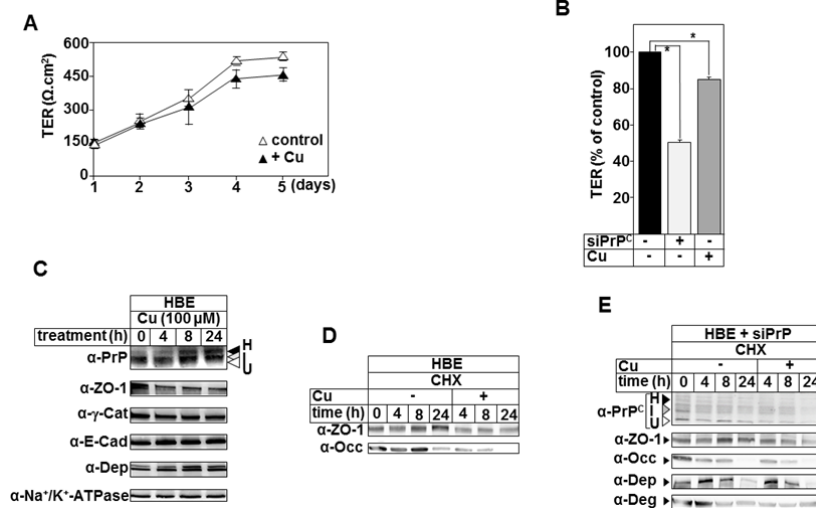


Figure 10: PrP^C protects adherent and desmosome proteins from oxidative-associated degradation.

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

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

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

(E) Degradation rate of PrP^C, ZO-1, occludin (Occ), desmoplakin (Dep) and desmoglein (Deg) in PrP^C-knockdown HBE cells (si-PrP) using cycloheximide (CHX) assays. For the

indicated times, si-PrP HBE cells were incubated in the presence of 100 µg/ml of CHX and in the absence (-) or presence (+) of 100 µM of copper. Proteins extract were separated on SDS-PAGE gels and proteins of interest were detected using anti-ZO-1, anti-occludin, and-desmoplakin and anti-desmoglein antibodies.

Figures Legends of Supplementary figures

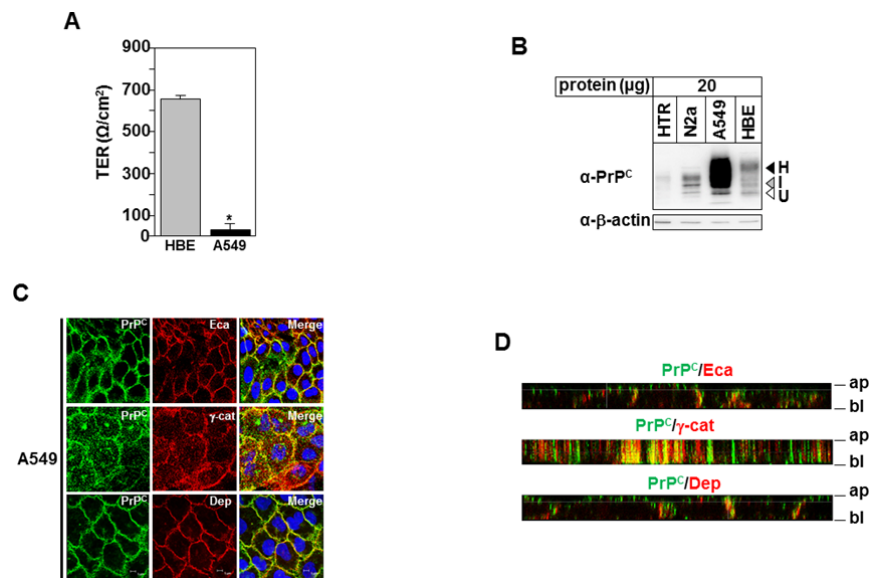


Figure S1: Trans-epithelial resistance (TER), expression, and localization of PrP^C and junctional proteins in A549 cells.

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

(B) Immunoblot detection of PrP^C protein in HTR, N2a, A549 and HBE cells. Equal amounts of protein extracts (20 μg) from the indicated cell lines were separated on 12% SDS-PAGE, transferred into nitrocellulose, and immunoblotted using the monoclonal anti-PrP antibody (SAF-32). The high- (H), intermediate- (I), and unglycosylated (U) forms are indicated, respectively by black, gray, and white arrowheads. β-actin (40 kDa) was detected as an internal loading control. **(C)** PrP^C colocalization with E-cadherin (E-cad), γ-catenin (γ-Cat) and desmoplakin (Dep) in A549 cells. **(D)** X/Z projections were reconstructed from horizontal optical section of labelled A549 cells at 10 days confluency.

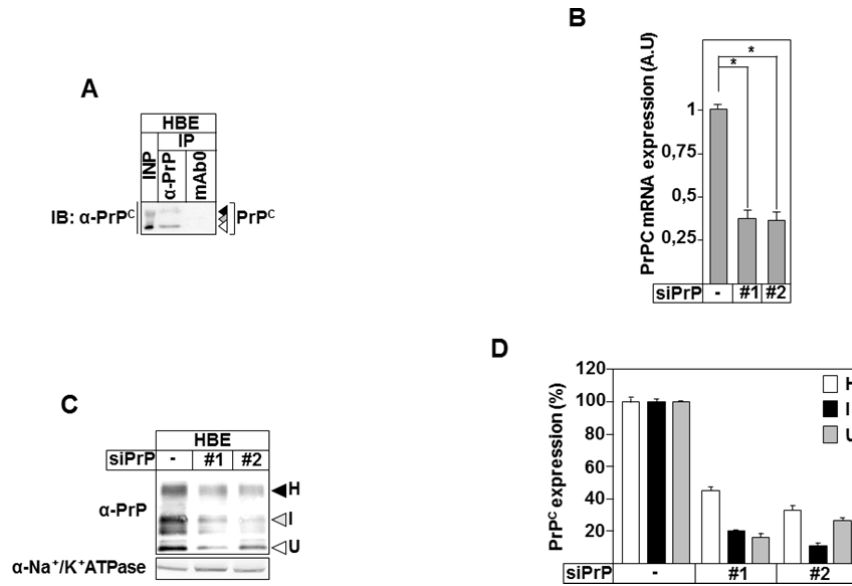


Figure S2: PrP^C immunoprecipitation control and PrP^C knockdown in HBE cells.

(B-C) PrP^C knockdown using two specific siRNA (#1 and #2). 48 h after transfection. mRNA and proteins were isolated and quantified by RT-qPCR (B) and by western blot using SAF-32 mAb (C) and image J analysis (D). Data are expressed as mean ± SE (n=4). Values overwritten with stars are significantly different from the control (0 h) (P < 0.05).

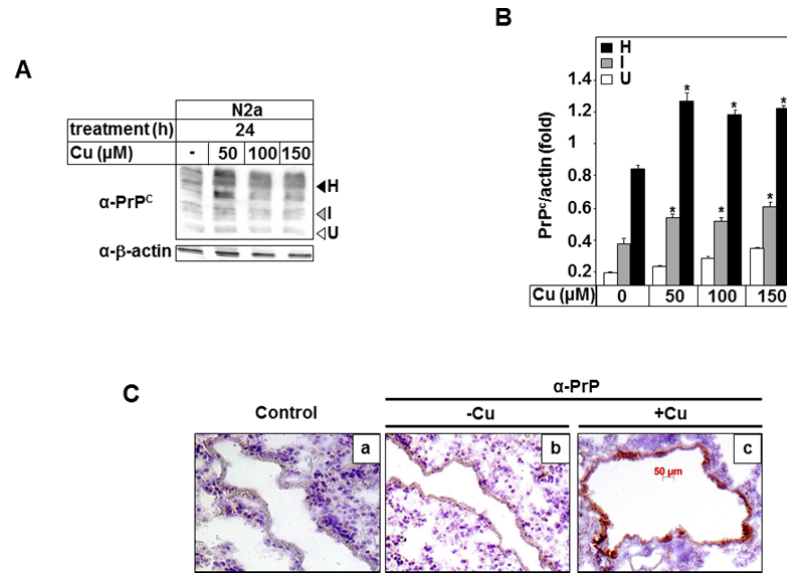


Figure S3: Copper stimulation increased PrP^C protein expression in mice bronchial epithelial tissue and in N2a neuroblastoma cells.

(A) Immunolocalization of PrP^C using mAb anti-PrP (SAF32) in mice bronchial tissue in the absence (b) or in the presence of copper treatment (c). (a) Negative controls.

(B) N2a cells were treated with copper sulfate in a dose (μM) dependent manner and cell lysates were subjected to immunoblots using anti-PrP (SAF-32) or anti- β -actin antibody. The high- (H), intermediate- (I), and unglycosylated (U) forms are indicated, respectively, by black, white, and gray arrowheads. (C) ImageJ quantification of the expression of the three glycosylation forms of PrP^C protein standardized to Na⁺/K⁺-ATPase expression in HBE cells. Data are expressed as mean \pm SE (n=4). Values overwritten with stars are significantly different from the control (0 h) ($P < 0.05$).

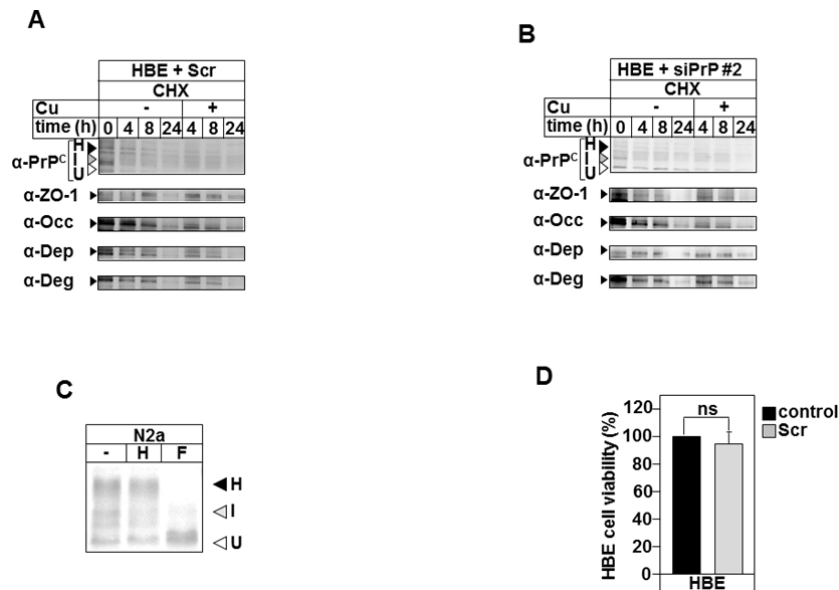


Figure S4:

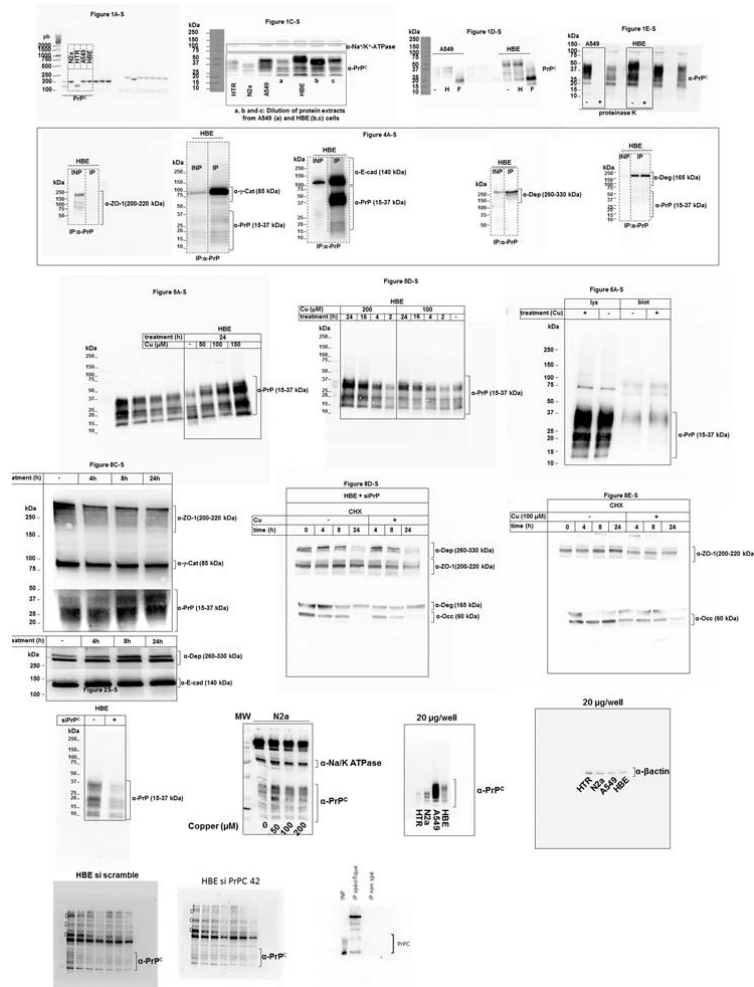
(A-B) Degradation rate of PrP^C, ZO-1, occludin (Occ), desmoplakin (Dep), and desmoglein (Deg) in si-Scramble (Scr) (A) or PrP^C-knockdown or HBE cells (si-PrP (43)) (B) using cycloheximide (CHX) assays. For the indicated times, si-PrP HBE cells were incubated in the presence of 100 µg/ml of CHX and in the absence (-) or presence (+) of 100 µM of copper. Proteins extract were separated on SDS-PAGE gels and proteins of interest were detected using anti-ZO-1, anti-occludin, anti-desmoplakin and anti-desmoglein antibodies.

(C) Endoglycosidase H (H) and N-glycosidase F (F) digestion profiles of PrP^C protein in N2a proteins extracts. (D) Control and (Scr) HBE cells were were trypsinized and harvested 48 h after transfection and the dead cells were assessed by MTT assays. Data are expressed as mean ± SE (n=4). Values overwritten with stars are significantly different from the control (0 h) (P < 0.05).

Antioxidants and Redox Signaling

Involvement of the Prion Protein in the Protection of the Human Bronchial Epithelial Barrier against Oxidative Stress (DOI: 10.1089/ars.2018.7500)

This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.



Copper Homeostasis and Oxidative Stress in Polarized Cystic Fibrosis Human Bronchial Epithelia: Role in Inflammation Responses

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

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

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

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

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

⁵Univ. Aix-Marseille, CNRS, CEA, Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille (BIAM), UMR 7265, CEA Cadarache, Saint-Paul-les Durance F-13108, France.

Running Title: Copper in cystic fibrosis human bronchial epithelia.

Address correspondence to:

Dr. Mohamed Benharouga

LCBM-UMR5249

DRF-BIG, CEA-Grenoble

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

Téléphone: (33)-4-38-78-44-51

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

E-mail: mohamed.benharouga@cea.fr

Abstract

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

In CF, initial inflammatory responses have been postulated as key steps in the pathogenesis of the lung disease. Previous studies have also indicated that the CF airway epithelium contributes to the hyper-inflammatory process. However, the causes of such inflammation, particularly bronchial epithelial inflammation, in the absence of any bacterial and/or pro-inflammatory stimulus is not well known. In addition, most of the results regarding epithelial inflammatory responses were obtained using different cells lines, leading to conflicting conclusions, particularly regarding the involvement of CFTR protein in this process. Alterations in the CF lung oxidant/antioxidant status has been proposed as a candidate for triggering early inflammation via the activation of the NF κ B system. However, direct evidences are still missing. Using healthy (16HBE14o-; HBE), CF (CFBE14o-; CFBE), and isogenic corrected-wild type CFTR CF (CFBE-wt) cells, we characterized the inflammation and oxidative profiles in relation to the CFTR function and expression. Measurement of the secretion of, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 (A, E, F) and TNF- α showed that CF bronchial cells present an intrinsic inflammation that was not corrected upon a rescue of CFTR function or expression (CFBE-wt). Compared to HBE, CFBE cells showed an alteration in the oxidant (mitochondria and unfolded protein response; UPR) and antioxidant system (Cu/Zn-SOD and Mn-SOD). Only UPR activation was corrected upon CFTR function and expression rescues in CFBE cells. The most interesting results were the detection of an intracellular stress associated to a significant decrease in copper (Cu) concentrations in CFBE cells. Finally, we showed that oxidative stress and inflammatory responses were tightly associated with copper concentrations in HBE cells. Altogether, these data highlight new therapeutic tracks in targeting anti-oxidant pathways to reduce oxidative stress and inflammation in CF cells.

Introduction

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

The most common CF mutation corresponds to a deletion of a phenylalanine (F) at position 508 of the CFTR protein (F508del-CFTR). This mutation causes an abnormal conformation to F508del- CFTR leading to its recognition, retention and degradation at the endoplasmic reticulum (ER) compartment⁵. Even if the gating of the channel is affected by the F508 deletion, the mutated protein retains some functionality as a Cl- channel⁶. The absence of a functional CFTR at the plasma membrane dysregulates ions and water flux, leading to dehydrated secretion, thick mucus and reduced clearance of inhaled particles, including bacteria. These dysregulations are associated with persistent infection and chronic inflammation, two major causes of morbimortality in CF population^{1,7}. The CF airway contains large concentrations of several pro-inflammatory mediators including tumor necrosis- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, and IL-17^{8–10}. The airway epithelial cells are known to release various inflammatory mediators, which appear to be sensitive to alterations in CFTR function. An activation of the pro-inflammatory nuclear factor- κ B (NF- κ B) has also been reported to be increased in response to CFTR dysfunction^{11–14}. The CF airway epithelium is also characterized by a decrease in the secretion of anti-inflammatory mediators^{15–18}. Importantly, even in the absence of bacterial or viral pathogens, exacerbated inflammation has been reported in the respiratory tract of CF infants^{19–21}. The inflammatory process characterized by the presence of a high density of acute inflammatory cells, such as neutrophils and macrophages^{22,23} and by an excessive CF cells production and secretion of proinflammatory cytokines, such as IL-8 and IL-6^{24–26}. The origin of inflammation in CF has been a matter of debate and appears to be the consequence of a hyperactivation of NF- κ B transcription factor and ER retention of CFTR-F508del²⁷. However, CFTR correction in epithelial cells did not allow a return to

normal levels of cytokine's secretion, revealing an activated inflammatory intrinsic pathway in CF epithelial cells ²⁸⁻³⁰, and rising the question on how a single mutation (delF508) might impact epithelial innate inflammatory response. The dysregulated inflammatory response in CF is complex, as it involves a multitude of stimuli, including oxidative stress (OxS). Evidences supporting the occurrence of OxS in cystic fibrosis (CF) is extensive ^{31,32}. OxS is defined as a disequilibrium in the pro- and antioxidative balance ³³. The prominent of the pro-oxidants responses manifests by an increase in the levels of the reactive oxygen species (ROS) that are generated by oxygen during oxidation reactions ³⁴. In CF, ROS levels are increased ^{35,36} and participate in the injury of the lung by overwhelming endogenous antioxidant defenses. This causes the release of inflammatory mediators that damage the epithelial cell surface, along with an impairment of bacterial clearance ^{37,38}.

The link between CF-associated OxS and CFTR defects has previously been reported ³⁹. ER retention of misfolded CFTR-delF508 protein has been associated with the activation of the unfolded protein response (UPR), and ER calcium expansion ³⁹. Importantly, CFTR dysfunction has been associated with an innate defect in the metabolism of glutathione (GSH), characterized by a low GSH levels in the bronchial epithelial liquid ⁴⁰. Moreover, low activity of copper (Cu) and zinc (Zn) dependent superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), and mitochondrial dysfunctions have been observed in cells with abnormal CFTR expression ^{37,41-43}. Altogether, these results indicate that in CF, the bronchial epithelial antioxidant defense system is failing, especially at the enzymatic (Cu/Zn-SOD) and redox system levels (GSH). Importantly, these systems are sensitive to copper homeostasis. This metal acts as an activator for Cu/Zn-SOD and as a natural substrate for the chelation by GSH ⁴⁴. Copper is also an important trace element for cellular function. Nevertheless, it becomes toxic when its cellular homeostasis is disrupted. Copper-induced oxidative stress has been documented in vitro and in vivo ⁴⁴, yet the in vitro effects of metal-induced oxidative stress have not been studied in bronchial epithelial cells. The role of copper homeostasis in redox

imbalance and inflammatory processes in lung epithelial cells in relationship to CFTR expression and activity is still unknown.

Hence, in the present study, we investigated three major processes in relation to the intracellular redox balance and inflammation in CF bronchial cells, namely i) oxidant and antioxidant statuses; ii) alteration in the inflammation profile, iii) the role of CFTR and copper in redox balance and inflammation. We demonstrated that CF bronchial epithelial cells exhibit, i) significantly higher levels of ROS and catalase activity, ii) decreased Cu/Zn- and Mn-SOD activity, iii) decreased copper, iron and zinc concentration. Furthermore, we characterized the relationship between inflammation and the OxS, and revealed the role of copper in CF-associated inflammatory processes.

Material and Methods

Cell culture

The experiments were performed using human bronchiolar epithelial cell lines: 16HBE14o- (abbreviated as HBE), expressing wild-type CFTR; CFBE41o- derived from a CF patient (abbreviated as CFVE)), homozygous for the dF508 mutation (dF508/dF508); CFBE-wtCFTR (abbreviated as CFBE-wt), CFBE41o- cells stably transfected with wt-CFTR protein (a generous gift from Dieter Gruenert, University of California at San Francisco, CA). The cells were grown in Eagle's minimal essential medium (MEM) (Thermofisher, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest, France) at 37°C under 5% CO₂. The cells were grown in plastic dishes coated with an extracellular matrix containing fibronectin, collagen and bovine serum albumin. Where indicated, cells were treated with vehicle, with different concentrations of copper (Cu), of bathocuproine disulphonate (BCS), a copper chelator, or of CFTR chloride channel inhibitor; CFTRinh-172 ⁴⁵, for the indicated times.

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

The plasma membrane cAMP-dependent halide conductance of BHK cells expressing wt- and mutants CFTR was determined using iodide efflux technique, as previously described ⁴⁶. Iodide efflux was initiated by replacing the loading buffer with efflux medium (composed of 136 mM nitrate). The extracellular medium was replaced every minute with the efflux buffer (1 ml). After a steady state was reached, the intracellular cAMP level was raised by agonists (10 μM forskolin, 0.2 mM CTP-cAMP, and 0.2 mM isobutyl-methyl xanthane) to achieve maximal phosphorylation of the CFTR protein. The collection of the efflux medium resumed for an additional 6–9 min. The amount of iodide in each sample was determined with an iodide-selective electrode (Orion).

Extraction of total RNA and reverse transcription

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

Quantitative polymerase chain reaction

The level of mRNA of UPR target genes; IRE1, ATF6, PERK and XBP-1 has been assessed using real-time RT-PCR (Biorad, France). The PCR was performed

using the primers shown in Table 1 and SYBR green PCR core reagents according to the manufacturer's instructions (Biorad, France). PCR conditions were as described by Alfaidy et al. 2013. The results were normalized to 18S rRNA expression levels. Relative expression was evaluated with $\Delta\Delta CT$ method.

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

Table 1: Primers used for real-time RT-PCR. FW: Forward, BW: Backward (reverse primer)

Cells lysates

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

Electrophoresis and Immunoblotting

Total cell extracts were prepared as described ⁴⁷. Protein samples were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The blots were probed using monoclonal anti-CFTR antibodies; L12B4 (Millipore, France). Primary antibodies were visualized by horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG and ECL detection Kit (Covalab, France). Immunoblotting of Na⁺/K⁺-ATPase α 1-subunit was performed with the mouse monoclonal (α 6F, DSHB, University of Iowa) antibodies.

Cell viability using MTT test

Cells were cultured in 96 wells plate upon confluency. Following the treatments, cells were incubated 4h in phenol red free medium containing 10% of MTT ([4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma). The MTT solution was finally replaced by MTT lysis solution (10% Triton X-100 and 0.1 N

HCl in anhydrous isopropanol), and the resulting optical density (DO) was determined after measurement of the difference between 570 nm and 690 nm absorbance.

Intracellular copper determination

To evaluate the intracellular copper concentration, cells were collected and stored at room temperature (RT). Samples were vacuum-dried and mineralized in 70% nitric acid before analysis with Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) with a Varian, Vista MPX instrument. The copper (Cu), iron (Fe) and zinc (Zn) content were reported relatively to the cells number (nM/10⁶ cells).

ROS Measurements

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

Catalase enzyme activity assays

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

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

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

Glutathione peroxidase (GPx) activity

The GPx activity was determined according to the method of Flohe and Gunzler⁵⁰. The reaction is based on the reduction of organic hydroperoxides to alcohols by GPx, along with the oxidation of reduced glutathione (GSH) to oxidized

glutathione (GSSG). GSSG is then reduced by glutathione reductase (GR) in the presence of NADPH. The GPx activity in the samples is determined by following the decrease in NADPH absorption at 340 nm for 3 min.

Mitochondrial Isolation

Isolation of mitochondria from cell pellets was achieved using a differential centrifugation procedure ⁵¹. The pelleted bronchial cells were resuspended in 250 μ l of mitochondrial isolation buffer (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) and homogenized with 15 strokes in a Dounce homogenizer (Fisher Scientific, France) on ice. To obtain mitochondria, the homogenate was subjected to the differential centrifugation procedure described previously ⁵¹. Mitochondrial purity and isolation efficiency were assessed by determination of lactate dehydrogenase (LDH) and glutamate dehydrogenase (GDH) activities.

GDH and LDH Activities

To assess mitochondrial fraction contamination by cytosolic components we measured LDH and GDH activities in the mitochondrial and cytosolic fractions ⁵². LDH and GDH are enzymes exclusively found in the cytosol and mitochondria, respectively. Before LDH and GDH analyses, the mitochondrial pellets were resuspended in PBS and lysed by the addition of lauryl dimethylamine N-oxide to a final concentration of 0.3% (vol/vol). LDH activity in both fractions was determined kinetically by monitoring the loss of NADH at 340 nm for 10 min. GDH activity was determined as previously reported ⁵³. The assay quantified GDH activity based on the consumption of NADH in the transamination of α -ketoglutarate (oxoglutarate) monitored at 340 nm. Purity and isolation efficiency were expressed as percent of the total activity of LDH and GDH in the samples.

Aconitase and Fumarase Activity Assays

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

which 30 mM potassium phosphate (pH 7.4), and 0.1 mM L-malate were added. Aconitase and fumarase activities were expressed as units per μg of protein.

Cytokine secretion by sandwich ELISA

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

Statistical analysis

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

Results

Bronchial epithelial ROS production is independent of CFTR expression and function.

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

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

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

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

These observations also suggest that other sources, independent of CFTR, might participate in the generation of ROS, thus promoting the development of the CF-associated oxidative stress (OxS). To better evaluate the OxS in CFBE compared to HBE and CFBE-wt cells, we assessed various causes of the OxS that have been

reported in CF; these included the stress of the ER, the innate defect in the metabolism of mitochondria, the abnormalities in antioxidant enzyme, and inflammation^{37,41,43}.

Antioxidants enzymes activities in the bronchial epithelial cells

First, we measured the activities of the cytosolic superoxide dismutases (SOD) Cu/Zn form (Cu/ZnSOD), and the mitochondrial SOD manganese form (MnSOD). Both enzymes are the first line of defense against the deleterious effects of reactive oxygen species⁵⁶. Our results demonstrate that at the cellular level, both activities are decreased in CFBE compared to HBE cells (Fig. 2 A and 2B). Interestingly, the stably expression of wt-CFTR in CFBE cells did not correct this defect, suggesting that both activities are independent of the CFTR expression. The superoxide dismutase (SOD) enzymatically scavenges the superoxide anions (O_2^-), converting them to hydrogen peroxide (H_2O_2). The H_2O_2 so produced is removed by the enzymes catalase and glutathione peroxidase (GPx). Thus, we evaluated the activity of catalase and GPx in healthy and CF bronchial epithelial cells. As reported in figures 2C, the catalase activity is almost two fold higher in CFBE compared to HBE cells, confirming the over-production of CF-associated ROS. However, the catalase activity was not corrected by overexpressing wt-CFTR protein (Fig. 2C). Finally, we did not observe any changes in GPx activity in CFBE cells compared to HBE and CFBE-wt, suggesting a limited role of GPx in CF-associated OxS (Fig. 2D).

In vitro markers of Mitochondria Oxidative Stress

Mitochondria is the primary site of H_2O_2 generation by aerobic metabolism^{56,57}. At the mitochondrial level, the MnSOD is responsible for eliminating H_2O_2 generated by the electron transport chain, therefore protecting the mitochondria from oxidative damage. As the activity of MnSOD is reduced in CFBE cells (Fig. 2B), we assessed the mitochondrial function in relation to CF disease and CFTR protein. First, we determined the purity of the mitochondrial fraction prepared from HBE, CFBE and CFBE-wt cells, by measuring LDH and GDH activities, indicators of the cytosol contamination and mitochondrial enrichment⁴³, respectively. In this study, we could recover $\sim 85.7 \pm 2.5\%$ of the total GDH activity detected in HBE, CFBE and CFBE-wt homogenates (Fig. S-1A), the remaining activities were present in the cytosolic fraction. For LDH, only $\sim 5.7 \pm 0.8\%$ of the total activity were detected in the mitochondrial fractions (Fig. S-1B).

These results indicate that the mitochondrial fractions are relatively free of cytosolic contamination.

To assess the presence of oxidative stress in the mitochondria we measured the activities of aconitase and fumarase. The activity of aconitase was inactivated by the oxidants. In contrast, fumarase activity was unaffected by such stimuli ⁵⁶.

Our results showed that mitochondria from CFBE cells displayed 80% lower aconitase activity compared to HBE cells (Fig. 2E). The loss of aconitase activity in CFBE cells was independent of CFTR expression, since similar loss in CFBE-wt cells was observed (Fig. 2E). Mitochondrial fumarase activities were however comparable between the CFBE, CFBE-wt and control HBE cells (Figure 2F). These results support the conclusion that CF bronchial epithelial cells have an intrinsic OxS that appears to be independent of CFTR expression and function.

In vitro indicators of endoplasmic reticulum (ER) stress

ER stress and UPR (Unfolded Protein Response) activation have been a focus of interest of several studies, particularly for the calcium homeostasis dysregulation and inflammation pathways activation ⁵⁸. Yet the relationship with CFTR expression and ROS production is still unclear. UPR is mediated by the activation of three ER transmembrane stress sensors: IRE1 (inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease-1); PERK (PKR-like ER kinase); and ATF6 (activating transcription factor) ⁵⁸⁻⁶⁰. In our study, activation of the UPR was monitored by quantitative PCR (qPCR) analysis. Compared to HBE cells, the levels of the three UPR-associated activation were significantly higher in CFBE cells (Fig. 3A-3D). The levels of expression of PERK (Fig. 3A), XBP-1 (Fig. 3B), IRE1 (Fig. 3C) and ATF6 (Fig. 3D) were ~2.5, ~2.3, ~2 and ~0.5 fold higher in CFBE cells.

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

Inflammatory profile of healthy and cystic fibrosis bronchial epithelial cells

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

Hence, we analyzed inflammatory profiles of healthy (HBE) and CF (CFBE) bronchial epithelial cells. Using ELISA assays, we evaluated both the production and secretion of different cytokines; IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-10, IL-17 (A,F,E) and TNF- α . All these cytokines were reported to be dysregulated in CF, particularly in broncho-alveolar lavage (BAL) fluid from CF patients¹⁶. For HBE cells, except IL-6 and IL-8 cytokines for which the levels of secretion were significantly higher than the production (Fig. 1B and 1C), the others cytokines, IL-1 β , TNF- α , IL-17A and IL-17F showed opposite profiles (Fig. 4A, E, F and G). For these cytokines, the levels of secretion were significantly reduced compared to their production (Fig. 4A, E, F and G). These results suggest that in normal bronchial epithelial cells all tested cytokines are constitutively produced. However, the secretion appears to be constitutive for IL-6 and IL-8, and needs induction for IL-1 β , TNF- α , IL-17A and IL-17F. For IL-17E, no differences were observed between production and secretion (Fig. 4H). IL-10, a potent regulatory cytokine that decreases inflammatory responses and T-cell stimulation, was not detected in medium, while its production was close to ~63 pg/mg of protein (Fig. 1D).

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

IL-8 secretion is associated with CFTR function

The data regarding the involvement of CFTR protein in the control of the inflammatory profile in CF lung epithelial cells is very conflicting and depends on the protocols, conditions of culture and cell type of cells used. We used HBE cells known for their ability to develop a highly polarized cell layer. To evaluate the

effect of CFTR inhibition on pro-inflammatory cytokines secretion, HBE cells were treated with CFTRinh-172. First, we tested the effect of this drug on the cell viability since CFTRinh-172 was reported to disturb the mitochondrial function in HELA cells. A dose and time dependent treatment have been evaluated and the summary of these results is reported on figure 5A. Compared to untreated HBE cells, treatment with concentration as high as 100 μ M did not affect cell viability, excluding any apoptotic effect of CFTRinh-172 (Fig. 5A).

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

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

In addition to UPR and mitochondria dysfunction, intracellular biometals such as zinc (Zn), copper (Cu) and iron (Fe) might participate into ROS production. Reduced metal might undergo a Fenton reaction and form highly toxic hydroxyl radicals (\bullet OH), that induce an OxS⁶¹. To evaluate the intracellular concentration of Cu, Zn and Fe, in HBE, CFBE and CFBE-wt cells we used inductively coupled plasma mass- spectrometry (ICP-MS) analysis. Hepatocyte cell line; HpeG2 was used as a control to validate the measurement. These cells are known to participate in metal detoxification. Compared to HBE cells, the intracellular concentrations of Cu (Fig. 6A), Fe (Fig. 6B), and Zn (Fig. 6C) were significantly decreased. The introduction of wt-CFTR did not correct the deficiency of these biometals (Fig. 6A-6C), suggesting that other mechanisms and/or other proteins are responsible for the observed CF bronchial epithelial cells dyshomeostasis.

Effect of copper treatment on healthy and CF inflammatory responses

The results reported in figures 2A, 2B and 2E showed a decrease in Cu/Zn- and MnSOD activities and the presence of a mitochondrial dysregulation in CF bronchial epithelial cells. Moreover, previous data showed a decrease of cytoplasmic and mitochondrial concentration of glutathione, a potent Cu chelatore, in CF lung epithelial cells³⁷. Based on these results, we hypothesized

that copper is a biometal with a critical importance in CF, particularly in relationship to OxS and inflammation.

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

However, the treatment of HBE cells using different copper concentrations did increase the intracellular copper concentration and ROS production (Fig. S-3), indicating that extracellular copper elevation, as was reported in BAL of CF patients ⁶², induced OxS that might be the cause of the generated inflammation.

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

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

Discussion

In this study, we have shown that bronchial epithelial cells homozygous for the delF508 mutation exhibited a constitutive secretion of pro-inflammatory cytokines and an intrinsic oxidative stress response. These two phenomenon were evaluated in the absence of any bacterial infection, a condition that represents the earliest step of cystic fibrosis (CF) development ^{37,63}. The cellular model that we used is representative of the bronchial tissue, the first line of defense against the external environment and infections ⁶⁴. Unlike other bronchial cell lines, these cells are characterized by their ability to develop a highly polarized cell layer ⁶⁵. Despite the fact that the cells used do not originate from primary cultures, they have the advantage to be isogenic for CFBE and CFBE-wt, validating the corrective effect of CFTR-wt. Also, we did not use the Air Liquide Interface (ALI) culture model. This system does not allow collecting media samples from the apical side to assess the levels of secreted cytokines.

In CFBE cells, we confirmed the presence of an oxidative stress by measuring the production of ROS. These results are in agreement with previous reports using different cellular models ⁶⁶. In our conditions, neither the expression nor the inhibition of the CFTR activity did affect the levels of ROS production. The statements that CFTR was involved in triggering an oxidative stress were supported by the measurement of ROS in the broncho-alveolar fluid (BAL) of cystic fibrosis patients ⁶⁷. These measurements were carried out in a fluid rich in neutrophils, the first producer of ROS, and in virulent bacteria ⁶⁷. At the cellular level, the link between oxidative stress and CFTR activity was made indirectly by measuring the glutathione concentration (GSH) and the activity of antioxidant enzymes, such as Cu/Zn-SOD ³⁷. Moreover, our results confirmed a decrease in the antioxidant response that was not corrected by the CFTR-wt protein. We have, for the first time, shown that the activity of Mn-SOD, an important enzyme for mitochondrial function, was decreased in CF bronchial cells. This result is in the line with observed decreases in the aconitase activity, an enzyme associated with mitochondrial activity, showing that local production of H₂O₂ is not eliminated by Mn-SOD; this might contribute in a long term in the overproduction of ROS. The correction with the CFTR-wt protein did not modify this activity confirming that the production of ROS by CFBE cells occurs independently of the CFTR protein. Another parameter involved in the production of ROS is the UPR system. The

latter has been well described in CF, particularly in relation to calcium homeostasis ⁶⁸. However, the link with the CFTR protein was still under debate. Using an isogenic model, we showed that the expression of the CFTR protein (CFBE-wt) corrected this defect and reduced the expression of the UPR actors; PERK, IRE1, XBP1 and ATF6, in CFBE cells. These results are in line with those published previously, showing that correction of CFTR-delF508 trafficking decreased UPR activation ⁶⁹.

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

Using ICPM-MS, we showed strong deregulations in the homeostasis of Cu, Zn and Fe. The decrease in their intracellular concentrations in CFBE compared to HBE cells was not corrected by CFTR-wt. The existence of such deregulations is well documented in the BAL of CF patients ⁷¹. However, the direct effect of these metals on the function of bronchial cells remains to be investigated. The evaluation of the effect of copper on the inflammatory response of HBE cells was further investigated due to its association to several CF-cellular abnormalities ^{72,73}. In addition to elevated Cu in BAL of CF patients, we and other reported a decrease in Cu/Zn-SOD activity (Fig. 2 A) ⁷¹. We have also shown that the mitochondrial activity, for which copper is the first electron donor, was reduced in CFBE cells.

In addition, it is well established that the homeostasis of glutathione, an important cell copper chelator, is deregulated in CF ³⁷. In copper-treated HBE cells, we observed that only the secretion of IL-6 and IL-8 were increased. However, the secretion of TNF- α , a potent pro-inflammatory cytokine, was reduced, following copper treatment. For IL-10, an anti-inflammatory cytokine, copper treatment did not affect its secreted levels but it increased its production.

Altogether these results show that cytokines that respond to infectious stimuli are not affected by copper variations, while IL-6 and IL-8, known to respond to oxidative stress ³⁷ are stimulated by this metal. Hence, one can speculate that copper deregulations in CF patients might be causative of the oxidative stress often observed in this pathology. Nevertheless, it would be interesting to establish a link between NF κ B activation and the cupric status in CFBE cells. Indeed, NF κ B along with AP1 were shown to regulate the transcription of several CF-associated pro-inflammatory cytokines ³⁷. The correlations between copper and inflammation, as well as the correlations between oxidative stress and ROS production, and the impairment of antioxidant defenses, provide evidences that the production of ROS by the CFBE cells might strongly contribute to the activation of the inflammatory process. Better characterization of the importance of the bio-metals identified in CFBE cells, and the demonstration of their relation to lung diseases, might advance our understanding of the lung micro-environment, especially in lung diseases associated to chronic inflammation.

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

References

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

12. Weber, A. J., Soong, G., Bryan, R., Saba, S. & Prince, A. Activation of NF-kappaB in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl⁻ channel function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281, L71-78 (2001).
13. Saadane, A., Soltys, J. & Berger, M. Role of IL-10 deficiency in excessive nuclear factor-κB activation and lung inflammation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 405–411 (2005).
14. Perez, A. et al. CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* 292, L383–L395 (2006).
15. Tabary, O. et al. High susceptibility for cystic fibrosis human airway gland cells to produce IL-8 through the I kappa B kinase alpha pathway in response to extracellular NaCl content. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 3377–3384 (2000).
16. Bonfield, T. L., Konstan, M. W. & Berger, M. Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104, 72–78 (1999).
17. Kammouni, W., Figarella, C., Baeza, N., Marchand, S. & Merten, M. D. *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide Induces CF-like Alteration of Protein Secretion by Human Tracheal Gland Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 305–311 (1997).
18. Tabary, O. et al. Selective Up-Regulation of Chemokine IL-8 Expression in Cystic Fibrosis Bronchial Gland Cells in Vivo and in Vitro. *Am. J. Pathol.* 153, 921–930 (1998).
19. Dakin, C. J. et al. Inflammation, Infection, and Pulmonary Function in Infants and Young Children with Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 904–910 (2002).
20. Khan, T. Z. et al. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 1075–1082 (1995).
21. Muhlebach, M. S., Stewart, P. W., Leigh, M. W. & Noah, T. L. Quantitation of Inflammatory Responses to Bacteria in Young Cystic Fibrosis and Control Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 186–191 (1999).

22. Bergoin, C. et al. Cell and cytokine profile in nasal secretions in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 1, 110–115 (2002).
23. Roum, J. H., Buhl, R., McElvaney, N. G., Borok, Z. & Crystal, R. G. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 75, 2419–2424 (1993).
24. Escotte, S. et al. Fluticasone reduces IL-6 and IL-8 production of cystic fibrosis bronchial epithelial cells via IKK-beta kinase pathway. *Eur. Respir. J.* 21, 574–581 (2003).
25. Rottner, M., Kunzelmann, C., Mergey, M., Freyssinet, J.-M. & Martinez, M. C. Exaggerated apoptosis and NF- κ B activation in pancreatic and tracheal cystic fibrosis cells. *FASEB J.* 21, 2939–2948 (2007).
26. Venkatakrisnan, A. et al. Exaggerated Activation of Nuclear Factor- κ B and Altered I κ B- β Processing in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23, 396–403 (2000).
27. Rottner, M., Freyssinet, J.-M. & Martínez, M. C. Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. *Respir. Res.* 10, 23 (2009).
28. Tabary, O. et al. Calcium-dependent regulation of NF- κ B activation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell. Signal.* 18, 652–660 (2006).
29. Courtney, J. M., Ennis, M. & Elborn, J. S. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 3, 223–231 (2004).
30. Virella-Lowell, I. et al. Effects of CFTR, interleukin-10, and *Pseudomonas aeruginosa* on gene expression profiles in a CF bronchial epithelial cell Line. *Mol. Ther.* 10, 562–573 (2004).
31. van der Vliet, A., Eiserich, J. P., Marelich, G. P., Halliwell, B. & Cross, C. E. Oxidative stress in cystic fibrosis: does it occur and does it matter? *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 38, 491–513 (1997).
32. Brown, R. K. & Kelly, F. J. Evidence for Increased oxidative Damage in Patients with Cystic Fibrosis. *Pediatr. Res.* 36, 487–492 (1994).
33. Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C. & Chapelle, J. P. [Oxidative stress]. *Rev. Med. Liege* 62, 628–638 (2007).

34. Aprioku, J. S. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J. Reprod. Infertil.* 14, 158–172 (2013).
35. Sadowska-Woda, I., Rachel, M., Pazdan, J., Bieszczad-Bedrejczuk, E. & Pawliszak, K. Nutritional supplement attenuates selected oxidative stress markers in pediatric patients with cystic fibrosis. *Nutr. Res.* 31, 509–518 (2011).
36. Laguna, T. A. et al. Decreased Total Serum Coenzyme-Q10 Concentrations: A Longitudinal Study in Children with Cystic Fibrosis. *J. Pediatr.* 153, 402–407.e1 (2008).
37. Galli, F. et al. Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1822, 690–713 (2012).
38. Cantin, A. M. et al. Antioxidants in cystic fibrosis☆Conclusions from the CF Antioxidant Workshop, Bethesda, Maryland, November 11-12, 2003. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 15– 31 (2007).
39. Ribeiro, C. & Lubamba, B. Role of IRE1 α /XBP-1 in Cystic Fibrosis Airway Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 118 (2017).
40. Day, B. J., van Heeckeren, A. M., Min, E. & Velsor, L. W. Role for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein in a glutathione response to bronchopulmonary pseudomonas infection. *Infect. Immun.* 72, 2045–2051 (2004).
41. Back, E. I. et al. Antioxidant deficiency in cystic fibrosis: when is the right time to take action? *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 374–384 (2004).
42. Tirouvanziam, R. et al. High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 4628–4633 (2006).
43. Velsor, L. W., Kariya, C., Kachadourian, R. & Day, B. J. Mitochondrial oxidative stress in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35, 579–586 (2006).
44. Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C. J., Kuča, K. & Musílek, K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch. Toxicol.* 90, 1–37 (2016).

45. Ma, T. et al. Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J. Clin. Invest.* 110, 1651–1658 (2002).
46. Sharma, M., Benharouga, M., Hu, W. & Lukacs, G. L. Conformational and Temperature-sensitive Stability Defects of the $\Delta F508$ Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Post-endoplasmic Reticulum Compartments. *J. Biol. Chem.* 276, 8942–8950 (2001).
47. Benharouga, M., Haardt, M., Kartner, N. & Lukacs, G. L. COOH-terminal truncations promote proteasome-dependent degradation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from post-Golgi compartments. *J. Cell Biol.* 153, 957–970 (2001).
48. Beers, R. F. & Sizer, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195, 133–140 (1952).
49. Marklund, S. & Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469–474 (1974).
50. Flohé, L. & Günzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 114–121 (1984).
51. Fernández-Vizarra, E. Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods* 26, 292–297 (2002).
52. Andersson, B. S. & Jones, D. P. Use of digitonin fractionation to determine mitochondrial transmembrane ion distribution in cells during anoxia. *Anal. Biochem.* 146, 164–172 (1985).
53. Schmidt, E. & Schmidt, F. W. [Methods and value of determination of glutamic acid dehydrogenase activity in the serum. A contribution to the importance of examination of enzyme relations in the serum]. *Klin. Wochenschr.* 40, 962–969 (1962).
54. Moskwa, P. et al. A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 174–183 (2007).

55. Boncoeur, E. et al. Oxidative stress induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase in cystic fibrosis lung epithelial cells: Potential mechanism for excessive IL-8 expression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 432–446 (2008).
56. Ambrosio, G. et al. Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J. Biol. Chem.* 268, 18532–18541 (1993).
57. Guidot, D. M., McCord, J. M., Wright, R. M. & Repine, J. E. Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation in vivo. *J. Biol. Chem.* 268, 26699–26703 (1993).
58. Martino, M. E. B. et al. Airway Epithelial Inflammation-induced Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Store Expansion Is Mediated by X-box Binding Protein-1. *J. Biol. Chem.* 284, 14904–14913 (2009).
59. Martino, M. B. et al. The ER stress transducer IRE1 β is required for airway epithelial mucin production. *Mucosal Immunol.* 6, 639–654 (2013).
60. Walter, P. & Ron, D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* 334, 1081–1086 (2011).
61. Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J. & Cuypers, A. Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3145–3175 (2012).
62. Smith, D. J., Anderson, G. J., Bell, S. C. & Reid, D. W. Elevated metal concentrations in the CF airway correlate with cellular injury and disease severity. *J. Cyst. Fibros.* 13, 289–295 (2014).
63. Cantin, A. M., Hartl, D., Konstan, M. W. & Chmiel, J. F. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 14, 419–430 (2015).
64. Eddens, T. & Kolls, J. K. Host defenses against bacterial lower respiratory tract infection. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 424–430 (2012).

65. Monterisi, S. et al. CFTR regulation in human airway epithelial cells requires integrity of the actin cytoskeleton and compartmentalized cAMP and PKA activity. *J. Cell Sci.* 125, 1106–1117 (2012).
66. Voisin, G. et al. Oxidative stress modulates the expression of genes involved in cell survival in F508 cystic fibrosis airway epithelial cells. *Physiol. Genomics* 46, 634–646 (2014).
67. Starosta, V., Rietschel, E., Paul, K., Baumann, U. & Griese, M. Oxidative Changes of Bronchoalveolar Proteins in Cystic Fibrosis. *Chest* 129, 431–437 (2006).
68. Ribeiro, C. M. P. & Boucher, R. C. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Cystic Fibrosis-Related Airway Inflammatory Responses. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 7, 387–394 (2010).
69. Bartoszewski, R. et al. Activation of the Unfolded Protein Response by Δ F508 CFTR. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39, 448–457 (2008).
70. Skjørringe, T., Møller, L. B. & Moos, T. Impairment of Interrelated Iron- and Copper Homeostatic Mechanisms in Brain Contributes to the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders. *Front. Pharmacol.* 3, (2012).
71. Bargagli, E. et al. Trace metals in fluids lining the respiratory system of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and diffuse lung diseases. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 42, 39–44 (2017).
72. Percival, S. S., Kauwell, G. P., Bowser, E. & Wagner, M. Altered copper status in adult men with cystic fibrosis. *J. Am. Coll. Nutr.* 18, 614–619 (1999).
73. Best, K., McCoy, K., Gemma, S. & Disilvestro, R. A. Copper enzyme activities in cystic fibrosis before and after copper supplementation plus or minus zinc. *Metabolism.* 53, 37–41 (2004).

Legend figures

Figure 1: Characterization of CFTR expression and ROS production.

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

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

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

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

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

Figure 4: Evaluation of inflammatory profile in healthy and CF bronchial cells.

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

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

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

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

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

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

Measurement of IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-17A (E), IL-17F (F), IL-17E (G) and TNF- α (H), released into the culture media (grey chart) and IL-10 (D), present in the protein extracts (black chart) of HBE after treatment with 100 μ M of Cu, during 24h. Cytokine levels were assayed using a quantitative sandwich enzyme-linked immunoassay in HBE and CFBE. Concentration are in pg/mg of protein extracts. Values overwritten with stars are significantly different from the control ($P < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SE (n=6)

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

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

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

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

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

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

Figure 1

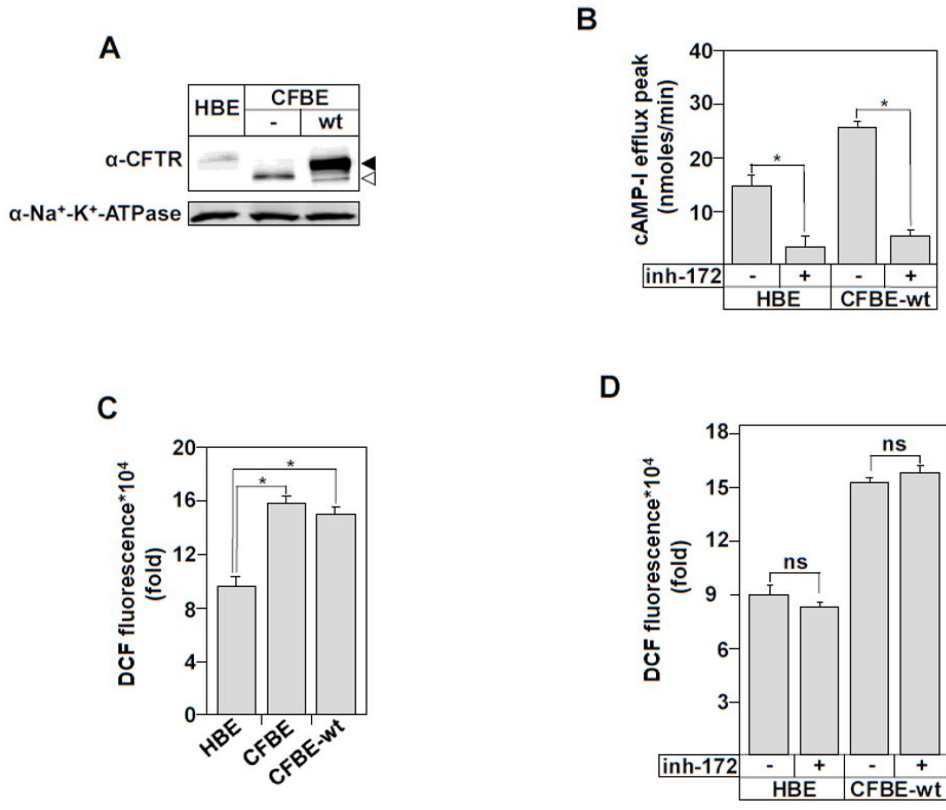


Figure 2

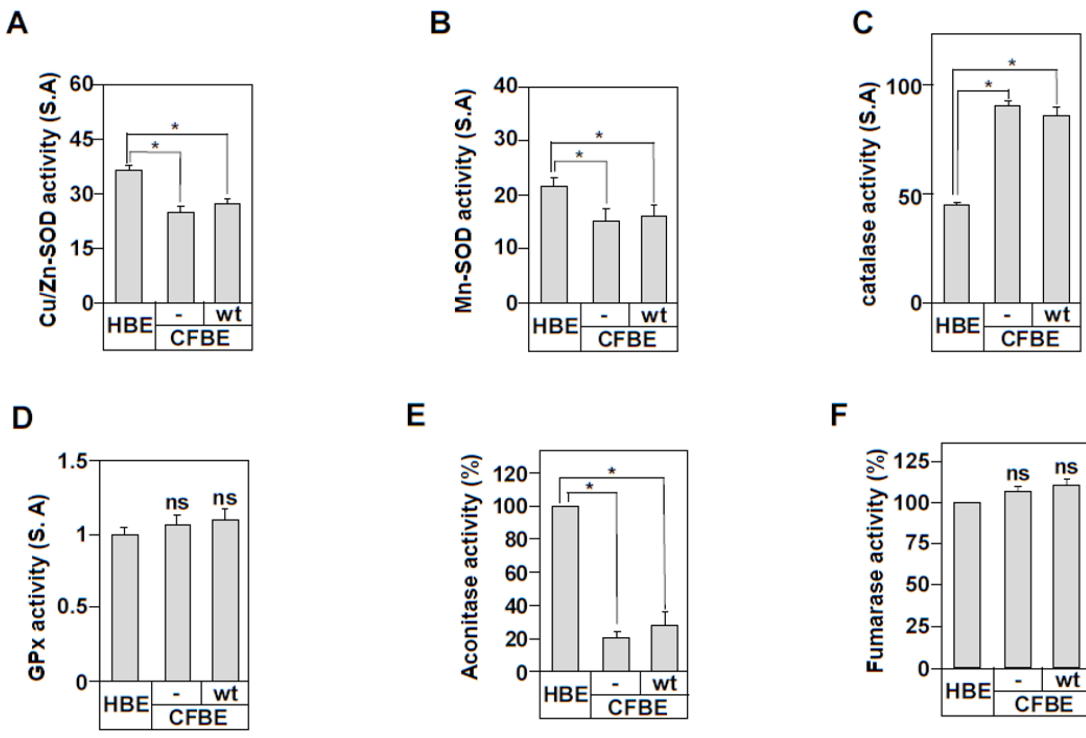


Figure 3

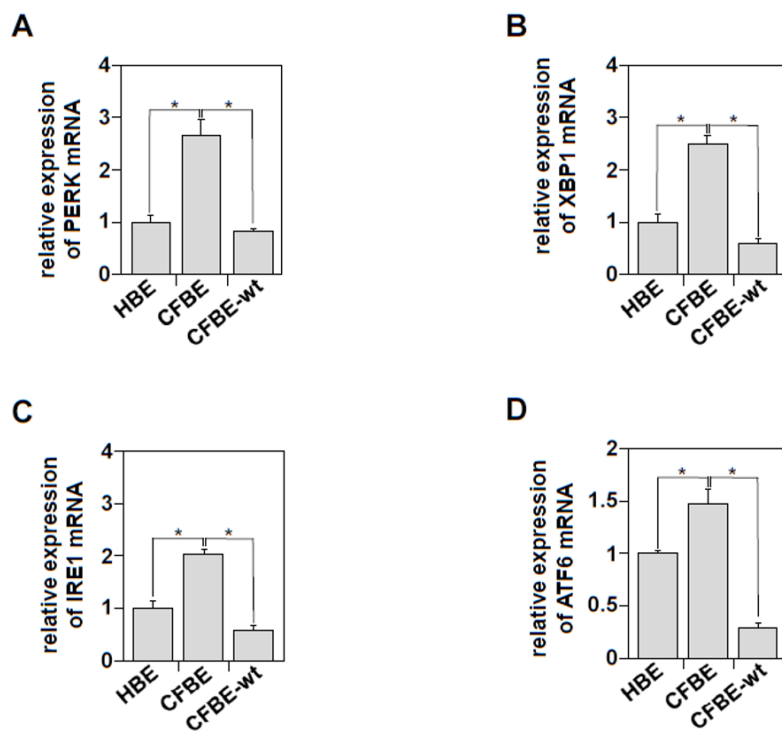


Figure 4

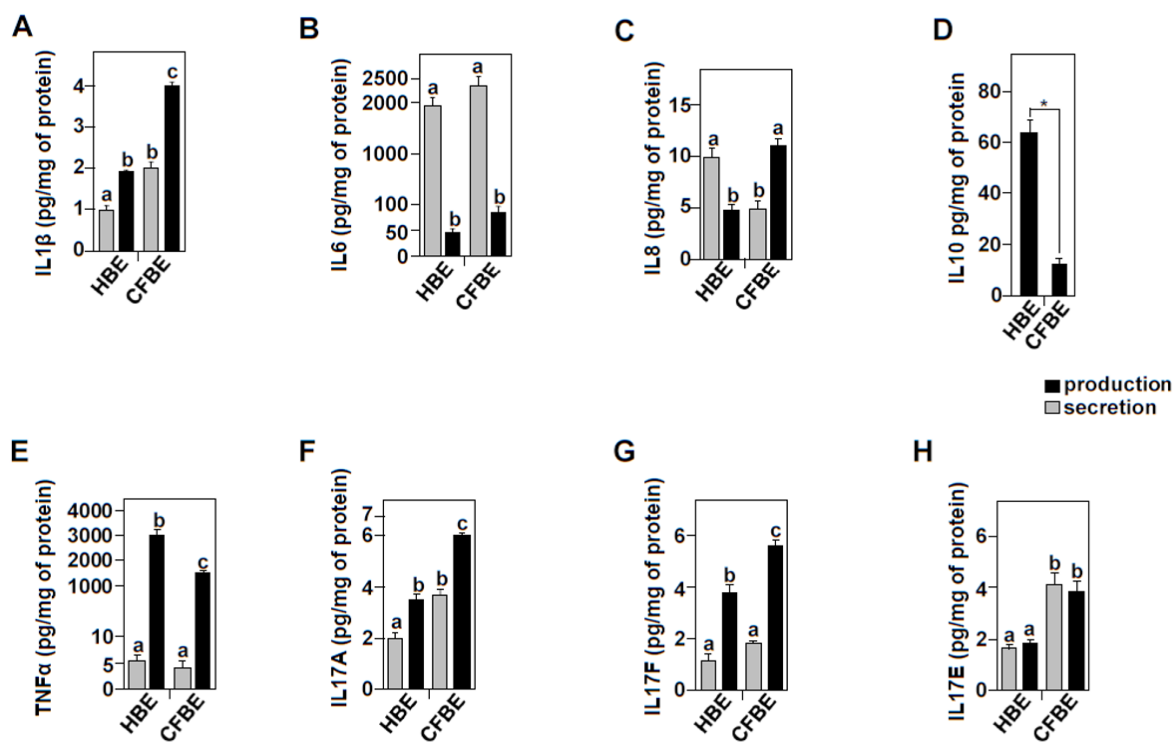


Figure 5

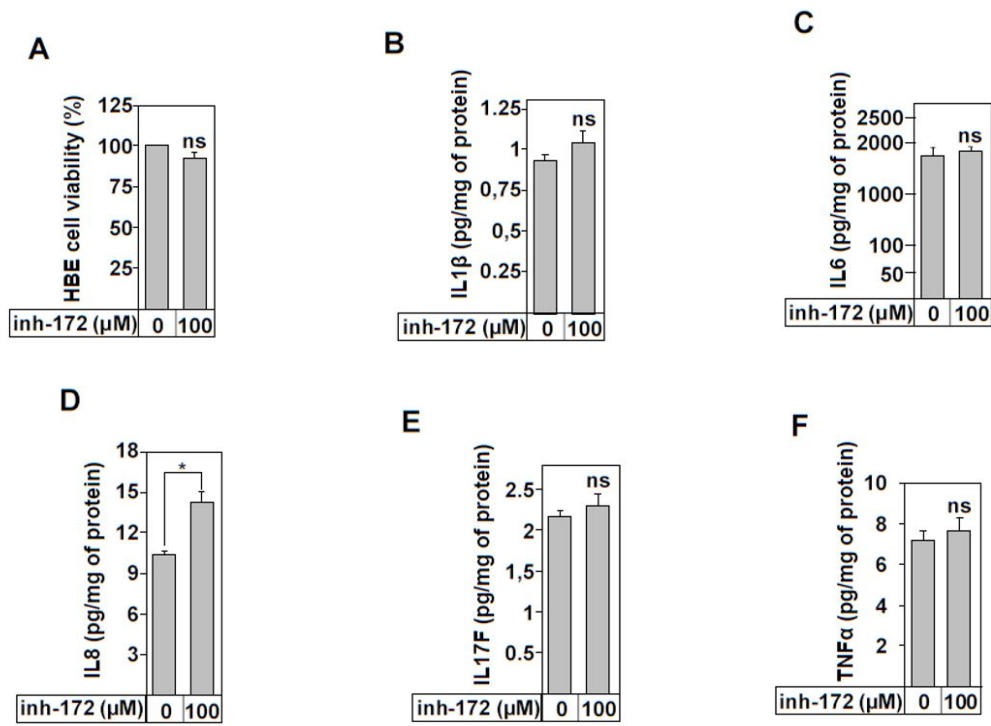


Figure 6

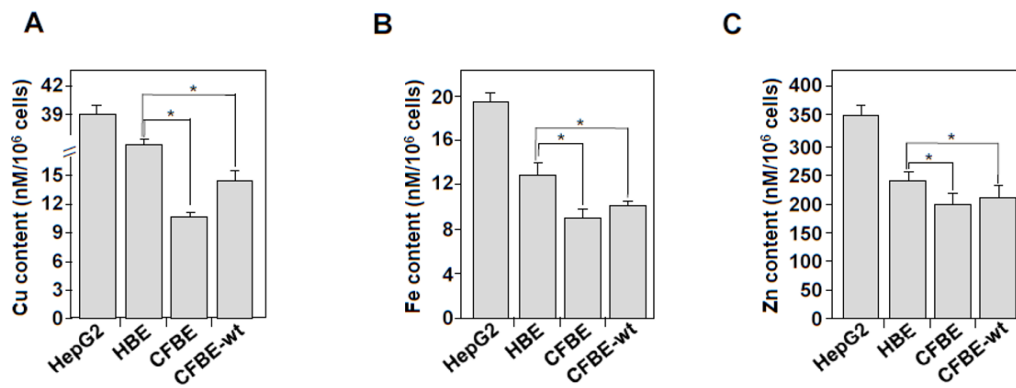


Figure 7

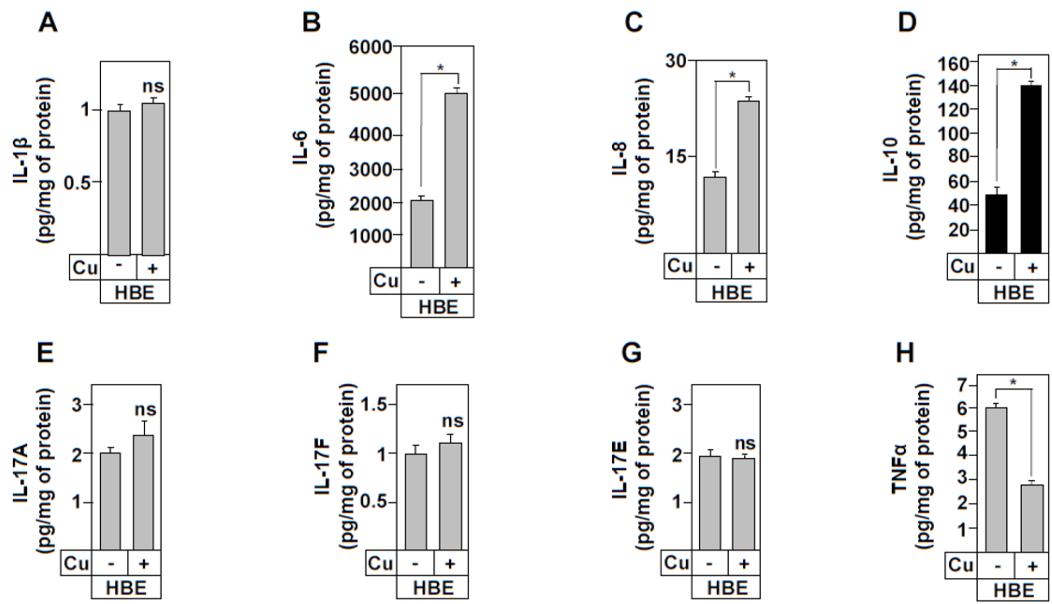


Figure S-1

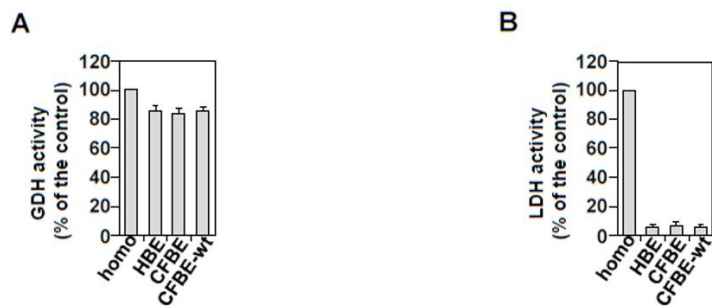


Figure S-2

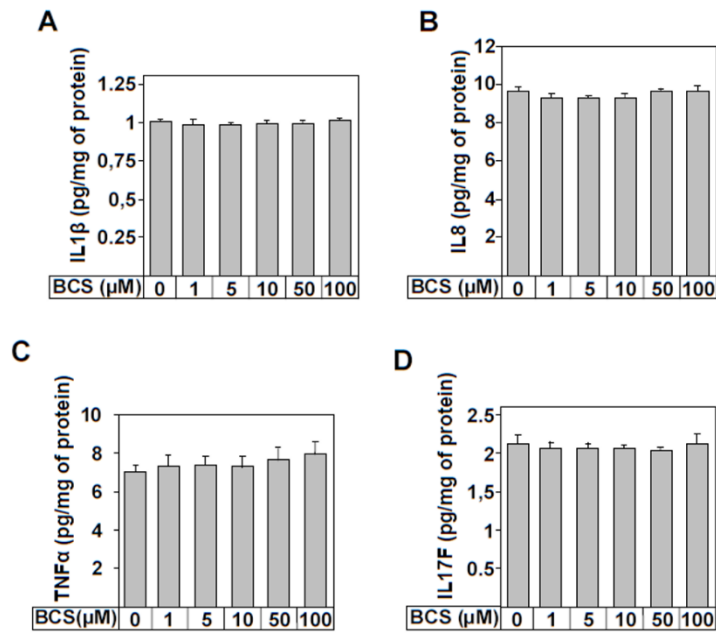
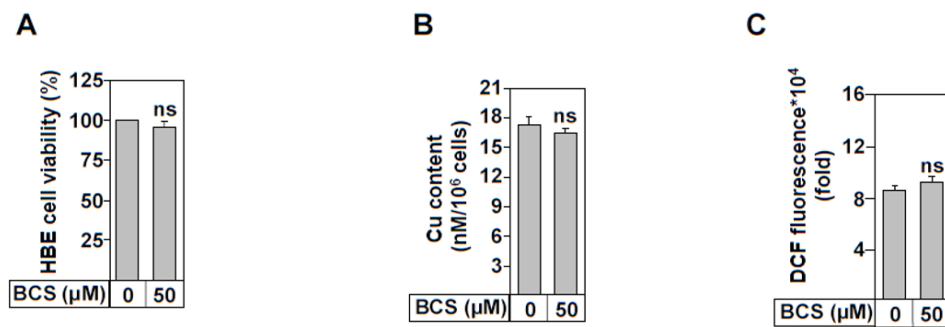


Figure S-3



Johanna CORMENIER

26 ans Française

145 cours de la Libération

38100 Grenoble

06 68 26 41 31

cormenierj@gmail.com

Docteur en Biologie Cellulaire

Recherche contrat post-doctoral



Expériences Professionnelles

- 2016-2019** Thèse de biologie cellulaire, CEA Grenoble (UMR5249)
Projet de thèse : La protéine prion cellulaire (Pr^{PC}) dans la mucoviscidose : rôle dans le maintien de la barrière épithéliale bronchique
- Janvier-Juin 2016** Stage de fin d'étude de Master 2, IBL Pasteur Lille (UMR8161)
Projet de recherche : Rôle du facteur de transcription ATF6 α dans l'établissement de la sénescence chez des fibroblastes normaux humains du derme
- Mai-Juin 2015** Stage de Master 1, MFP, Bordeaux (UMR5234)
- Avril-Juin 2014** Stage de Licence 3, LIENSS, La Rochelle (UMR7266)
- Avril-Juin 2013** Stage de validation de DUT, Université de Montréal (Canada)

Contributions scientifiques

- **Cormenier J.**, et al. (2019) *Cellular prion protein (Pr^{PC}) is up regulated in cystic fibrosis: Role of CFTR protein*. Soumit dans "Journal of cell science".
- **Cormenier J.**, et al. (2019) *The cellular prion protein (Pr^{PC}) contribute to the acute Pseudomonas aeruginosa lung infection in cystic fibrosis mice*. Soumit dans "Journal of Cystic Fibrosis".
- **Cormenier J.**, et al. (2019) *Secreted cellular prion protein (Pr^{PC}) participates in the cystic fibrosis inflammatory response: consequences on the bronchial epithelia barriers*. Journal of Cystic Fibrosis 18(S1):S1-S38.
- Kouadri A, El Khatib M, **Cormenier J.**, Chauvet S, Zeinyeh W, El Khoury M, Macari L, Richaud P, Coraux C, Michaud-Soret I, Alfaidy N, Benharouga M. (2019) *Involvement of the Prion Protein in the Protection of the Human Bronchial Epithelial Barrier Against Oxidative Stress*. Antioxid Redox Signal. 31(1):59-74.
- **Cormenier J.**, et al. (2018) *The Activating Transcription Factor 6 α (ATF6 α) mediates replicative senescence in human fibroblasts through a prostaglandin E2 pathway*. Mech Ageing Dev. 170 :82-91
- Druelle C, Drullion C, Deslé J, Martin N, Saas L, **Cormenier J.**, Malaquin N, Huot L, Slomianny C, Bouali F, Vercamer C, Hot D, Pourtier A, Chevet E, Abbadie C and Pluquet O. (2016) *ATF6 α regulates morphological changes associated with senescence in human fibroblasts*. Oncotarget. 7:67699-715.

Formations et diplômes

- 2019** Doctorat de Biologie Cellulaire, spécialité chimie et sciences du vivant. Université Grenoble-Alpes
Certificat d'expérimentation animale niveau 1 et 2 (obtenu en juin 2017)
- 2016** Master Biotechnologies, parcours Biochimie. Université La Rochelle
- 2014** Licence Sciences du vivant, parcours Biochimie. Université La Rochelle
- 2013** DUT Génie Biologique, analyses biologiques et biochimiques. IUT La Rochelle

Domaines de compétences

Techniques

- Travail en équipe
- Rédaction de rapport d'activité
- Communication orale en conférence
- Encadrement d'étudiants en stage
- Gestion des consommables, des équipements et des commandes
- Maîtrise des logiciels : Pack Office, Zen (Carl Zeiss), ImageJ, CFX Manager (BioRad), Endnote
- Langues : Français maternel, Anglais scientifique

Scientifiques

- Conception, organisation et planification d'un projet de recherche et des expérimentations associées
- Culture cellulaire
- Cytométrie en flux
- ELISA
- Western Blot, Dot-Blot, immunoprécipitation
- Clonage moléculaire, transformation bactérienne, extraction ARN, RT-qPCR.
- Microscopie optique et confocale (lumière blanche, fluorescence)
- Histologie
- Expérimentation animale sur modèles murins

Références

Dr Mohamed Benharouga, MCU UGA
Laboratoire de chimie et biologie des métaux (UMR5249)
mohamed.benharouga@cea.fr 04-38-78-44-51

Dr Olivier Pluquet, MCU Université Lille
Laboratoire M3T (UMR8161)
olivier.pluquet@ibl.cnrs.fr 03-20-87-10-26

Centres d'intérêt

Décoration d'intérieur
Athlétisme
Cuisine

Résumé

Une des caractéristiques physiopathologiques de la mucoviscidose (MV) est la perte de l'étanchéité de la barrière épithéliale (BE) intestinale et bronchique. Ce processus participe à la transmigration des cellules de l'inflammation et des pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa* (P.A). Cependant, les mécanismes moléculaires qui régissent ce phénomène sont toujours à déterminer. L'implication de la protéine CFTR a été proposée dans ce processus, cependant sa localisation apicale par rapport à la localisation latérale des jonctions intercellulaires (JI) suggère la participation d'autres protéines dans le maintien de la BE. Récemment, nous avons identifié la protéine prion cellulaire (PrP^C) comme partenaire des protéines des jonctions adhérentes (JA) et desmosomes (JD) dans les cellules bronchiques humaines. Dans ces cellules, PrP^C est d'abord adressée vers la membrane apicale avant d'être redirigée vers la membrane latérale où elle interagit, stabilise et protège les protéines des JA et JD contre le stress oxydatif. Toutefois, le rôle de la protéine PrP^C dans la MV, particulièrement dans le défaut de la BE, reste inconnu.

Ainsi, mon projet de thèse avait pour objectif la caractérisation du rôle de PrP^C dans le contrôle de la BE, *in vitro* (lignées cellulaires) et *in vivo* (modèles animaux), en relation avec la MV. J'ai ainsi *i*) étudié l'expression, la localisation, et le profil biochimique de PrP^C, *ii*) caractérisé l'expression des protéines des jonctions et leurs interactions avec PrP^C, et évalué l'impact de la protéine CFTR sauvage et mutée (dF508) sur le trafic et la stabilité membranaire de PrP^C, et *iii*) démontré l'implication de PrP^C dans la transmigration des neutrophiles et de P.A au niveau des voies aériennes.

L'ensemble de mes résultats ont démontré pour la première fois que dans la MV, la protéine PrP^C est mal adressée vers la membrane latérale pour stabiliser les protéines des jonctions avec lesquelles elle interagit. Ce défaut d'adressage serait une des conséquences de la mutation dF508. Le défaut d'adressage de la protéine PrP^C serait directement associé à la perméabilité de la BE aux neutrophiles et aux pathogènes comme P.A dans la MV.

Abstract

One of the pathophysiological features of cystic fibrosis (CF) disease is the loss of the tightness of the intestinal and bronchial epithelial barrier (EB). This process participates in the transmigration of inflammatory cells as well as pathogens, such as *Pseudomonas aeruginosa* (P.A). However, the underlying mechanisms are still poorly understood. The involvement of the CFTR protein has recently been proposed in this phenomenon, yet its apical and not lateral localization suggests the involvement of other factors in the maintenance of EB. Recently, we identified the cellular prion protein (PrP^C) as a partner of adherens (AJ) and desmosome junctions (DJ) proteins in human bronchial cells. In these cells, PrP^C is first addressed to the apical membrane before being redirected to the lateral membrane where it interacts, stabilizes and protects the AJ and DJ proteins against oxidative stress. Nevertheless, the role of the PrP^C protein in CF, particularly in the control of the EB, remains unknown.

Thus, the objectives of my thesis were to characterize *in vitro* (cell lines) and *in vivo* (animal models), in the context of CF, *i*) the expression, localization and biochemical profile of the PrP^C protein, *ii*) the expression of junctional proteins and their interactions with PrP^C protein and the impact of wild type and mutated CFTR (dF508) on the trafficking and membrane stability of PrP^C protein, and finally *iii*) the involvement of PrP^C protein in neutrophils and P.A transmigration in the CF airways.

Altogether, the results showed for the first time that in CF the PrP^C protein is not correctly addressed to the lateral membrane where it interacts and stabilizes the junctional proteins. The lack of PrP^C trafficking from the apical to the lateral membrane appears to be linked to the CFTR mutation. As a result, the EB loses its effectiveness and becomes permissive to neutrophils and pathogens like P.A.