



HAL
open science

Rôle de SLC6A14 dans la physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose

Julia Mercier

► **To cite this version:**

Julia Mercier. Rôle de SLC6A14 dans la physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS341 . tel-03616213

HAL Id: tel-03616213

<https://theses.hal.science/tel-03616213>

Submitted on 22 Mar 2022

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

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

Thèse de Doctorat

Sorbonne Université

Ecole doctorale 394

Spécialité Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Laboratoire de Mucoviscidose : Physiopathologie et Phénogénomique

Centre de recherche Saint-Antoine, UMR S 938

Rôle de SLC6A14 dans la physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose

Présentée par

Julia MERCIER

Pour obtenir le grade de

Docteur en Sciences de Sorbonne Université

Soutenue le

17 décembre 2021

Devant le jury composé de :

Pre Annick CLEMENT

Dr Dominique PIDARD

Dr Ignacio GARCIA-VERDUGO

Pre Pascale FANEN

Pr Marc CHANSON

Dr Loïc GUILLOT

Présidente du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

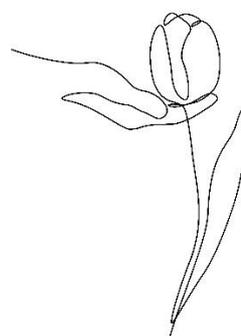
Examineur

Directeur de thèse

*« Sagesse n'est pas sagesse lorsqu'elle est trop fière pour pleurer,
trop sérieuse pour rire et trop pensive pour parler. »*

- Khalil Gibran

A mon Père,



Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres de mon jury, qui ont accepté de m'accorder de leur temps afin de participer à ma soutenance de thèse. Merci à tous d'avoir fait le déplacement, que ce soit physiquement ou virtuellement. Merci à Pre Annick Clement d'avoir accepté de présider ce jury. Votre parcours en tant que cheffe de service de pneumologie pédiatrique de l'hôpital Trousseau, votre historique au sein de mon laboratoire d'accueil et notre rencontre lors d'un entretien pour mon stage de M2 ont rendu cette présidence évidente à mes yeux. Un grand merci aux Dr Dominique Pidard et Dr Ignacio Garcia-Verdugo, qui a pu suivre l'évolution de cette thèse au fil des comités de suivi, d'avoir accepté le rôle de rapporteurs. Merci de vous être investis dans la relecture, l'amélioration et le peaufinage de ce manuscrit de manière si attentive et rigoureuse et ce, toujours avec bienveillance. Vos corrections et suggestions m'ont été précieuses. Merci également aux Pre Pascale Fanen et Pr Marc Chanson de participer à ce jury en tant qu'examineurs. J'en profite pour remercier également Dr Stéphane Lourdel, qui n'a pas pu faire partie officiellement du jury mais qui m'a accompagnée au cours de cette thèse en tant que tuteur, a participé à mes comités de suivi de thèse et a pu suivre mon parcours depuis la licence avec tout autant de bienveillance que ses collègues sus-mentionnés. Enfin, merci à tous pour nos échanges scientifiques passés et/ou à venir qui, je l'espère, pourront perdurer dans le temps.

Un grand merci à Pre Harriet Corvol pour m'avoir accueillie au sein de cette équipe soudée et de m'avoir permis de passer une thèse sereine et dans la bonne entente. J'ai conscience que ce n'est pas donné à tous les doctorants et, pour cela, je ne peux qu'être profondément reconnaissante. Merci d'avoir toujours été à l'écoute et de t'être rendue disponible au besoin. Merci également de m'avoir donné l'opportunité d'assister aux « staff muco » au fil de mes années au laboratoire. Cela m'a permis de concrétiser et donner du sens à mon travail, et de la motivation pour mes recherches. Entre frustrations et résilience, cela fait du bien de se rappeler pour quoi, pour qui, on travaille. Je remercie donc également indirectement les patients, ainsi que leurs familles, qui sont d'une force inimaginable et qui ont aussi eu l'occasion de m'inspirer lors de nos rencontres aux colloques organisés par l'association Vaincre La Mucoviscidose. Je ferai tout pour que les étoiles qui brillent dans mes yeux et la flamme scientifique qui me fait vibrer, dédiées aux pathologies respiratoires et particulièrement à la mucoviscidose, ne cessent jamais de briller.

Dr. Loïc Guillot. Un énorme merci à toi, chef, pour ces trois années de thèse. En comptant le stage de M2 et la prolongation de 3 mois on est presque à quatre ans, remarque ! Il t'en aura fallu du courage :p Merci de m'avoir formée, encadrée, toujours soutenue et encouragée. Tu as fait tout cela avec une certaine pudeur, qui a fait que je ne m'en suis pas toujours aperçue tout de suite. Merci d'avoir participé à l'amélioration de la gestion de mes émotions... Même si je ne peux pas te promettre que les larmes ne coulent pas en écrivant ceci. Merci pour tes challenges inopinés, tels que l'annonce de l'encadrement d'une étudiante... le jour J ! Merci pour ta confiance en mes capacités. Enfin, je finirai ce paragraphe qui, je l'imagine, doit te mettre un peu mal à l'aise, en citant Antoine de Saint-Exupéry : « Celui qui diffère de moi, loin de me léser, m'enrichit ». Merci de m'avoir fait grandir.

Je voudrais également remercier profondément Dr. Manon Ruffin et Claire Calmel pour la mise en place et l'aboutissement de ce projet ! Merci pour votre bonne humeur les filles et pour ces années passées à travailler (entre autres :p) à vos côtés. Merci Manon pour la transmission de ton savoir et pour ta grande bienveillance. En espérant que tu ne nous refasses pas un remake de Jack dans Titanic, nous pourrons peut-être de nouveau réaliser des exploits sportifs à l'avenir ;) Merci sincèrement Claire, mon petit cordon-bleu, pour ton soutien technique, mais aussi culinaire et surtout personnel, sans faille.

Une pensée particulière pour mon Tobibi, Tobias Foussignière, qui a débuté le projet avec nous en tant qu'ingénieur d'études et qui m'a formée à mon arrivée dans le laboratoire. Plus qu'un mentor, j'ai trouvé un ami qui restera cher à mon cœur. Merci pour tout, Maman Canard.

Merci également au Pr Philippe Le Rouzic, à qui je dois ma passion pour la mucoviscidose. Merci d'avoir fait ce cours génialissime durant ma troisième année de licence, dont je suis sortie bouleversée. A la fois fascinée et excitée par la physiopathologie de la muco, et coupable de ce sentiment au regard d'une terrible pathologie et des patients qui en souffrent. Merci pour ton accompagnement et ton soutien tout au long de mon cursus. Oh, et mes dents te remercient aussi pour les Magnum et autres sucreries de motivation.

Olivier, je pense partager l'avis de tous les anciens et futurs étudiants en te remerciant d'être le « papa du labo ». Merci pour ta présence, ton soutien, nos fous rires plus ou moins déplacés – mais après tout, ce ne serait pas drôle sinon ! (Pauvre petit souriceau...) Merci pour ton aura informatique qui m'aura sauvée de multiples fois de ces vilaines machines qui ne m'aiment pas et n'existent que pour me rendre chèvre ! Merci pour m'avoir permis de me « décharger » lorsque j'étais au plus mal. Merci de prendre à cœur la cachette des œufs de Pâques. Merci pour ta vision de la vie, similaire à la mienne. « Qui garde son âme d'enfant ne vieillit jamais ». En ce qui te concerne, tu es éternel. J'espère incarner *Vice Versa* encore longtemps à tes yeux, et avoir un jour l'occasion de travailler à tes côtés.

Merci à Viviane pour la transmission de tes connaissances et savoir-faire en microbiologie, ainsi qu'en jogging ! J'essaierai de mettre en pratique tous les conseils que tu m'as donnés, promis ! Merci également à Christophe et Juliette pour vos participations à nos réunions de labo, votre expertise fongique et votre bonne humeur lors de nos réunions festives.

Merci à Lhousseine pour ton sourire magnifique ainsi que pour ton expertise « pasteurienne », en particulier d'ordre culinaire ! A ce propos, j'attends toujours mon couscous... Un soleil à toi tout seul, merci d'avoir égayé mes journées.

Merci à mes co-doctorantes, Jeanne et Julie. Les 3J vont bientôt disparaître mais laisser derrière elles plein de souvenirs. Merci d'avoir partagé avec moi ces montagnes russes qui jalonnent la thèse, les chambres de congrès ou « les samedis au bureau ». Merci Julie pour cette reprise inoubliable de Claude François. Je vous souhaite tout le meilleur pour la suite, dans vos vies professionnelles mais également personnelles.

Ma thèse n'aurait pas été la même sans tous mes petits rayons de soleil. Merci à Pauline (aka maman poule), Gabrielle (ma padawan), Sylvain (mon poulain), Christie, Albane, Maëlle, Marion, Marie, Inès, et Astrid pour être ce que vous êtes. Merci pour les pauses thé/café chaleureuses et joviales dans le bureau étudiant, nos petits moments de « cancans », nos recherches d'appartements respectifs – des viageeeeeeeeeers *.* - nos danses endiablées – à Lieusaint ou devant les cuves de migration de Western blot... Merci également à tous les étudiants et personnels qui ont passé une petite portion de leur vie avec moi au laboratoire : Nathalie, Elena, Carla, Ines, Diego, Zheng, Samira, Victoire, Audrey, Floriane, Léa, Nawal,

Eloi... Je m'excuse pour ceux que je pourrais avoir oubliés, vous avez tous compté et marqué une page de mon histoire. Je vous embrasse fort.

Dans la même lancée, je remercie également tous les étudiants que j'ai pu encadrer et à qui j'ai pu enseigner lors de ma mission doctorale. Vous avez été géniaux et m'avez permis de ressentir quelque chose de très valorisant et touchant. Merci de m'avoir fait sentir que j'étais faite pour enseigner.

Merci également à mes amis doctorants et partenaires de choc pour l'organisation de la meilleure session d'animation scientifique et cinématographique du séminaire du Centre de Recherche Saint-Antoine et/ou la création du Club des Jeunes Chercheurs du CRSA : Kathleen, Robin, Rania, Justine, Garance, Ilhem, Jeanne, Anna, Hugo, Nawa, Tiphaine, Laeticia, Lara et Allan. Merci pour ces moments de partage, de stress, de crépage de chignon, mais surtout de rigolades et de kiff total. Je vous souhaite à tous une bonne fin de thèse et de beaux horizons pour la suite de votre carrière.

Un autre grand merci à mes indéfectibles partenaires de congrès Alexis et Anthony. Force à vous les gars !

Merci également à Hélène, Patricia et Stéphane pour votre présence et votre joie communicative. De manière non officielle, vous faites intégralement partie de l'équipe vous aussi ! *(A ceux qui lisent ce paragraphe et seront présents lors du pot de thèse, j'en profite pour vous mettre en garde : attention au remplissage automatique et magique de votre verre à proximité de Stéphane... 😊)*

Je tenais également à remercier mes anciens professeurs et encadrants, qui ont tous participé au développement de mon amour pour les sciences et la recherche : Marie-Noëlle Fiamma, Sabrina Gadet, Cédric Boisbunon, Safia Deddouche-Grass, Clément Carré, Arnaud Mailleux, Bruno Crestani, Madeleine Jaillet et ma chère Emmeline Marchal-Duval.

Enfin, je souhaiterais remercier mes amis de licence Inci, Maxime et Manu, qui ont partagé une partie de mon cursus, m'ont soutenue et ont cru en moi jusqu'au bout. Merci Inci d'être restée une si proche amie. Maxime, je te l'avais promis en licence – et étrangement j'ai une bonne mémoire en ce qui concerne les promesses – du coup voici ma superbe dédicace en

ton honneur. Merci d'avoir été là Maximus (et je meuble pour t'accorder encore plus de place dans mes remerciements), tu me dois bien un Big Fernand comme cadeau de soutenance, tiens ! :p A bientôt pour fêter ça ;)

Merci à Sadek, Laura, Harold, Elo, Elsa, mes amis de lycée, pour avoir été présents et de m'avoir soutenue durant ces années charnières. Merci également à Armand, Thomas M. Nicolas, Benj, pour les soirées jeu de société organisées durant le confinement et pour ce week-end prolongé dans les Cévennes. Merci de m'avoir sortie le nez de cette prenante, fatigante, stressante mais fascinante aventure qu'est la thèse. Je vous aime fort !

Merci aussi et surtout à tous les membres de ma famille pour leur amour, les bons et les mauvais moments. Vous avez fait de moi la femme forte, courageuse et déterminée que je suis aujourd'hui. Dédicace particulière à mes rocs, mes piliers, mes éléphants : ma maman et Nanou. Merci de vous être démenées comme les folles que vous êtes pour que la soutenance de cette thèse soit une réussite, et pour supporter mes aléas émotionnels quotidiens.

Une pensée également aux membres de ma famille partis trop tôt, ou trop rapidement, sur une si courte période. Papa, cette thèse t'est dédiée. Je sais que tu as été et seras avec moi tout au long de mon parcours. J'espère que de là où tu es, tu es fier. Je n'oublie pas Jeanne - ma cousine - Tonton Gilles, Mamie Claude, Papi Didi, ou encore avant cela Tonton Seb.

Enfin, Amour. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as pu m'apporter et m'apporte chaque jour. Merci d'être mon partenaire de vie et mon meilleur ami. Merci d'avoir enduré mes humeurs oscillantes au gré de la thèse, de t'être impliqué et d'avoir débattu avec moi du rôle de SLC6A14 et de LasB. La seule personne en dehors du labo qui pouvait me comprendre... Ces années n'ont pas été faciles de ton côté non plus, mais tu y es arrivé et tu t'en sortiras, j'en suis persuadée. Je lève mon verre à toutes nos années passées, et toutes celles à venir. Oh, et... je t'aime PLUS !

Pour finir, merci à vous, lecteur, qui prendrez la peine de lire ce manuscrit au-delà des remerciements.

Sommaire

Avant-texte	6
I- Liste des tables	7
II- Liste des figures	8
III- Liste des abréviations	10
Avant-propos	14
Introduction	16
Chapitre 1 - L'appareil respiratoire	17
I- Généralités	17
II- Epithélium des voies aériennes.....	18
a. Les cellules basales	19
b. Les cellules club	20
c. Les cellules ciliées	20
d. Les cellules caliciformes.....	20
e. Les cellules neuroendocrines	21
f. Les cellules à touffe ou <i>tuft cells</i>	21
g. Les cellules en collines ou <i>hillock cells</i>	22
h. Les cellules micro-pliées ou cellules M.....	22
i. Les cellules séreuses.....	23
j. Les pneumocytes	23
k. Les ionocytes	24
Chapitre 2 - La mucoviscidose	27
I- Epidémiologie.....	27
II- Le gène <i>Cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR)</i> et ses variants.....	28
a. Les variants de classe I.....	30

b. Les variants de classe II	30
c. Les variants de classe III.....	30
d. Les variants de classe IV.....	31
e. Les variants de classe V	31
f. Les variants de classe VI.....	31
III- Dépistage et diagnostic	31
IV- Symptômes et soins.....	33
a. Manifestations extra-pulmonaires.....	33
1. Atteintes digestives	33
a) Atteintes gastro-intestinales	33
b) Atteinte pancréatique exocrine	34
c) Atteinte hépatobiliaire.....	35
d) Soins et traitements des atteintes digestives	35
2. Autres atteintes extra-pulmonaires.....	36
a) Atteinte génitale.....	36
b) Atteinte osseuse	37
c) Atteinte rénale	37
d) Atteinte des glandes sudoripares	37
e) Atteinte ORL.....	37
f) Douleurs.....	38
g) Cancers.....	38
b. Manifestations pulmonaires.....	39
1. Physiopathologie pulmonaire et caractéristiques cliniques de la mucoviscidose.....	39
2. Les cycles d'infection-inflammation : « l'œuf ou la poule ? »	41
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
a) Généralités.....	43

b) Le « <i>quorum sensing</i> » (QS) de <i>P. aeruginosa</i>	45
c) Les facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	46
i. L'élastase LasB	47
ii. Le lipopolysaccharide (LPS)	48
iii. La flagelline	49
d) <i>P. aeruginosa</i> et réparation épithéliale.....	51
4. Soins et traitements de l'atteinte pulmonaire.....	53
a) Thérapie protéique	55
b) Thérapie génique	58
Chapitre 3 – <i>Solute Carrier Family 6 Member 14 (SLC6A14)</i> , un gène modificateur de la mucoviscidose.....	61
I- Mucoviscidose et gènes modificateurs	61
II- Le gène <i>SLC6A14</i> et sa protéine	63
a. Expression du gène <i>SLC6A14</i> et de sa protéine en conditions physiologiques	64
1. Généralités.....	64
2. Expression et régulation de <i>SLC6A14</i> dans le tractus gastro-intestinal	68
3. Expression et régulation de <i>SLC6A14</i> au niveau pulmonaire	69
b. Expression du gène <i>SLC6A14</i> dans les pathologies humaines	71
1. <i>SLC6A14</i> et cancer	71
2. <i>SLC6A14</i> et maladies coliques.....	72
3. <i>SLC6A14</i> et fibrose pulmonaire idiopathique	72
4. <i>SLC6A14</i> et maladies infectieuses	72
5. <i>SLC6A14</i> , obésité et infertilité	73
6. <i>SLC6A14</i> et mucoviscidose.....	74
a) Etudes d'association génétique.....	74
b) Rôle biologique de la protéine <i>SLC6A14</i> dans la mucoviscidose : hypothèses.....	77
i. Fonction au niveau gastro-intestinal	78

ii. Fonction au niveau pulmonaire.....	78
Objectifs de l'étude.....	82
Résultats	84
I- Etude d'association génétique de <i>SLC6A14</i> et mise en évidence de son rôle dans la voie de signalisation mTOR et la réparation épithéliale bronchique	85
a. Résumé.....	85
b. Article.....	86
II- Etude de la modulation de l'expression et de la fonction de la protéine SLC6A14 en contexte inflammatoire et infectieux de la mucoviscidose	108
a. Résumé.....	108
b. Article	109
Discussion et Perspectives.....	132
Références bibliographiques	145
Communications et formations scientifiques	189
I- Liste des publications.....	190
II- Liste des communications	190
a. Orales.....	190
b. Affichées.....	190
c. Projetées par visioconférence	191
III- Liste des congrès et événements organisés	191
IV- Formations	192
Annexes	193
I- Annexe 1 : Autres publications	194
a. <i>SLC6A14</i> , un gène modificateur de la mucoviscidose.....	194
1. Résumé	194
2. Article.....	195

b. Update on <i>SLC6A14</i> in lung and gastrointestinal physiology and pathophysiology: focus on cystic fibrosis.....	199
1. Résumé	199
2. Article	200
c. Gene therapy: a possible alternative to CFTR modulators?213.....	213
1. Résumé	213
2. Article	214
d. Flagellin from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> modulates SARS-CoV-2 infectivity in CF airway epithelial cells by increasing <i>TMPRSS2</i> expression	222
1. Résumé	222
2. Article	223
II- Annexe 2 : Premières analyses de RNAseq	233

Avant-texte

I- Liste des tables

Table 1. Les 10 variants du gène <i>CFTR</i> les plus fréquents chez les patients atteints de mucoviscidose français en 2019.....	29
Table 2. Les différentes atteintes organiques des patients mucoviscidosiques en fonction de leur âge	39
Table 3. Les modulateurs de <i>CFTR</i> actuellement sur le marché.....	56
Table 4. Expression du transcrit de <i>SLC6A14</i> chez l'homme et de <i>slc6a14</i> chez la souris	67
Table 5. Expression du gène <i>SLC6A14</i> au niveau transcriptionnel et protéique dans le tractus gastro-intestinal humain	69
Table 6. Expression du gène <i>SLC6A14</i> au niveau transcriptionnel et protéique dans le tractus respiratoire humain.....	70
Table 7. Expression du gène <i>SLC6A14</i> au niveau transcriptionnel et protéique dans d'autres pathologies humaines	71
Table 8. Associations entre le génotype de <i>SLC6A14</i> et les phénotypes tels que l'obésité ou l'infertilité	73
Table 9. Associations entre le génotype de <i>SLC6A14</i> et les phénotypes digestifs et respiratoires de la mucoviscidose	75

II- Liste des figures

Figure 1. Le système respiratoire humain.	17
Figure 2. Les différents types cellulaires présents de la trachée aux alvéoles	18
Figure 3. Microphotographies des différents types cellulaires épithéliaux des voies aériennes humaines.....	19
Figure 4. Structure et composition des espaces alvéolaires.	24
Figure 5. Diversité des types cellulaires présents dans l'épithélium trachéal de souris et expression de la protéine CFTR	25
Figure 6. Prévalence de la mucoviscidose dans le monde	27
Figure 7. Représentation des différentes classes de variants du gène <i>CFTR</i> et de leur impact sur l'expression et/ou la localisation de la protéine	30
Figure 8. Représentation de l'iléus méconial présent chez une partie des patients atteints de mucoviscidose.	34
Figure 9. Evolution de la fréquence des différentes pathologies hépatiques et digestives au cours de la vie des patients atteints de mucoviscidose.....	35
Figure 10. Physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose	40
Figure 11. Evolution de la fréquence des différentes espèces bactériennes identifiées dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose au cours de leur vie.....	40
Figure 12. Microphotographies de la bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
Figure 13. Représentation de divers acteurs du « <i>quorum sensing</i> » (QS) de la souche PAO1 de <i>P. aeruginosa</i>	46
Figure 14. <i>P. aeruginosa</i> et ses principaux facteurs de virulence	46
Figure 15. Voies de signalisation activées par la flagelline de <i>P. aeruginosa</i>	50
Figure 16. Représentation de l'impact des protéinases LasB et AprA sur la reconnaissance immunitaire induite par la flagelline de <i>P. aeruginosa</i>	51
Figure 17. Impact de <i>P. aeruginosa</i> sur la prolifération, la migration et la réparation épithéliale bronchique.....	53
Figure 18. Stratégies thérapeutiques de prise en charge de l'atteinte respiratoire des patients atteints de mucoviscidose.....	54
Figure 19. Cibles et modes d'action des différentes thérapies en fonction du variant de <i>CFTR</i>	56
Figure 20. Contribution relative des gènes modificateurs à la variabilité des phénotypes de la mucoviscidose	61

Figure 21. Association génotype-phénotype respiratoire dans la mucoviscidose.....	62
Figure 22. Représentation schématique de gènes modificateurs et de leur implication dans la variabilité des atteintes de la mucoviscidose et/ou dans l'efficacité des traitements	63
Figure 23. Configurations présumées de la protéine SLC6A14.....	65
Figure 24. Expressions différentielles de l'ARNm de <i>SLC6A14</i> et de la protéine SLC6A14 en fonction des différents tissus humains	66
Figure 25. Trafic de SLC6A14 du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique	68
Figure 26. Modèle de déséquilibre de liaison (DL) des douze variants génétiques de <i>SLC6A14</i> étudiés.....	76
Figure 27. Rôle supposé du transporteur SLC6A14 dans le poumon en réponse à l'infection par <i>P. aeruginosa</i>	79
Figure 28. Lien présumé entre le transporteur SLC6A14, le canal CFTR et la voie de signalisation du NO.....	80
Figure 29. Interactions entre SLC6A14 et les voies de signalisation PI3K-Akt-mTOR et Wnt- β -caténine	138
Figure 30. Schéma bilan récapitulant les résultats obtenus et autres pistes d'étude	143

En l'absence dans la légende de la précision « Extrait de », explicitant un emprunt brut, les figures ont été créées ou adaptées par mes soins à l'aide du site BioRender (<https://biorender.com>).

III- Liste des abréviations

#

3-oxo-C12-HSL N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone**3'UTR** 3' *Untranslated transcribed region***4E-BP1** *4E-binding protein 1***A****aa** Acide aminé**ADN** Acide désoxyribonucléique**AEM** Agence européenne du médicament**AHL** Acylhomosérine lactone**Alox5ap** *Arachidonate 5-lipoxygenase activating protein***AMM** Autorisation de mise sur le marché**ARN** Acide ribonucléique**ASL** *Airway surface liquid***ATB⁰⁺** *Amino acid transporter binding neutral and cationic amino acids* **α -MT** α -méthyl-DL-tryptophane**B****BECN1** *Beclin 1***BPCO** Broncho-pneumopathie chronique obstructive**BPIFA1** *BPI fold containing family A member 1***C****C4-HSL** : N-butyryl-L-homosérine lactone**CF** *Cystic fibrosis***CFBD** *Cystic fibrosis-related bone disease***CFC** *Cystic fibrosis Canada***CFF** *Cystic fibrosis foundation***CFLD** *Cystic fibrosis liver disease***CFRD** *Cystic fibrosis-related diabetes mellitus***CFTR** *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator***CFTR-KD** *CFTR-knockdown cells***CFTR-WT** *CFTR-wild type cells***COPII** Coatomer II**CRCM** Centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose**E****ECFS** *European cystic fibrosis society***eIF-2 α** *Eukaryotic initiation factor 2 α* **ERK** *Extracellular signal-regulated kinase***F****FOXI1** *Forkhead box II***FDA** *Food and drug administration***FLA** Flagelline**FPI** Fibrose pulmonaire idiopathique**G****GBEFC** *Brazilian cystic fibrosis study group***GLuc** *Gaussia luciferase***GM-CSF** *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor***GMPC** *Guanosine monophosphate cyclique***GWAS** *Genome wide association study*

H

HEK293 *Human embryonic kidney 293 cells*

hNE *Human neutrophil elastase*

HSP70 *Heat shock protein 70*

HSP90 *Heat shock protein 90*

I

IF *Immunofluorescence*

IFN γ *Interféron γ*

IHC *Immunohistochimie*

IL-1 β *Interleukine-1 β*

IL-4 *Interleukine 4*

IL-6 *Interleukine 6*

IL-8 *Interleukine 8*

IL-9 *Interleukine 9*

IL-17 *Interleukine 17*

IM *Iléus méconial*

iPSC *Induced pluripotent stem cells*

L

LasB *Elastase de *P. aeruginosa**

LBA *Lavages broncho-alvéolaires*

LPS *Lipopolysaccharide*

M

MAF *Minor allele frequency*

MAPK *Mitogen-activated protein kinase*

MeOH *Méthanol*

miR *Micro-ARN*

MMP9 *Métalloprotéinase matricielle-9*

mTOR *Mammalian target of rapamycine*

mTORC1 *mTOR complex 1*

mTORC2 *mTOR complex 2*

MUC5AC *Mucin-5 subtype AC*

MUC5B *Mucin-5 subtype B*

N

NBD1 *Nucleotide-binding domain 1*

NBD2 *Nucleotide-binding domain 2*

NF- κ B *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

P

PCR *Polymerase chain reaction*

PNEC *Pulmonary neuroendocrine cells*

PAMP *Pathogen-associated molecular pattern*

PAR-2 *Proteinase-activated receptor 2*

PGE₂ *Prostaglandine E₂*

PKC α *Protéine kinase C α*

PNDS *Protocole national de diagnostic et de soins*

pwCF *People with CF*

Q

QS *Quorum sensing*

R

RE *Réticulum endoplasmique*

S

SLC6A14 *Solute carrier family 6 member 14*

scRNAseq *Single cell RNA sequencing*

STAT3 *Signal transducer and activator of transcription 3*

SNP *Single nucleotide polymorphism*

SLC *Solute Carrier*

SERPINA1 *Serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1*

siARN *Short interfering RNA*

SEAP *Secreted alkaline phosphatase*

S6K *S6 protein kinase*

SN *Surnageant/supernatant*

T

TAS2R38 *Taste receptor 2 member 38*

TIR *Trypsine immune-réactive*

TLR4 *Toll-like receptor 4*

TLR5 *Toll-like receptor 5*

TNFR2 *Tumor necrosis factor receptor 2*

TNF α *Tumor necrosis factor α*

V

VEMS *Volume d'expiration maximal en une seconde*

W

WB *Western blot*

Wnt *Wingless-int*

WT *Wild-type*

Avant-propos

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques rares mortelles, d'origine autosomique et récessive, au sein de la population caucasienne. Elle touche plus de 70 000 patients dans le monde, dont près de 7 000 en France. Le gène *CFTR*, responsable de la maladie, a été découvert en 1989. Dès lors, de nombreux progrès scientifiques ont été réalisés, permettant le développement de différentes stratégies thérapeutiques et une augmentation de la qualité et de l'espérance de vie des patients. Néanmoins, il n'existe encore aucun traitement curatif à ce jour.

Les manifestations cliniques de la mucoviscidose sont nombreuses et touchent de multiples organes. La principale cause de morbidité et de mortalité des patients est l'atteinte pulmonaire, qui est caractérisée par des cycles d'infections et d'inflammation, responsables d'une dégradation progressive du tissu pulmonaire et, à terme, d'une insuffisance respiratoire.

Bien que la sévérité de la maladie soit en partie déterminée par le type de variants du gène *CFTR*, qui sont elles aussi très nombreuses, des études récentes ont montré que la variabilité des différentes atteintes s'explique également par d'autres facteurs environnementaux ou génétiques. Ces derniers sont appelés « gènes modificateurs » de la mucoviscidose.

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à un de ces gènes modificateurs, *SLC6A14*, dont certains variants génétiques ont été montrés comme étant associés à une aggravation des atteintes digestives et respiratoires de la mucoviscidose. Nous nous sommes particulièrement intéressés à son rôle dans la physiopathologie pulmonaire, ainsi qu'à la régulation de son expression et de sa fonction en contexte inflammatoire et infectieux, caractéristiques de la mucoviscidose.

L'apport de nouvelles connaissances sur le gène modificateur *SLC6A14*, qui fait l'objet de recherches depuis peu, est essentiel à une meilleure compréhension de la maladie ainsi qu'au développement de nouvelles pistes thérapeutiques. A terme, la prise en compte des gènes modificateurs dans la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose permettrait d'adapter les traitements et de tendre vers une médecine personnalisée.

En espérant que vous trouverez, au fil des pages, autant de plaisir à découvrir le fruit de nos recherches que nous avons pu en avoir à les récolter, je vous souhaite une bonne lecture.

Introduction

Chapitre 1 - L'appareil respiratoire

I- Généralités

L'appareil respiratoire est constitué d'un ensemble d'organes permettant les échanges gazeux entre un organisme et son environnement. Chez l'Homme, l'air est conditionné et conduit tout au long de « l'arbre trachéo-bronchique », division successive des voies aériennes en structures de plus en plus petites (**Figure 1**). Le passage de l'air se fait d'abord dans les voies aériennes supérieures : fosses nasales, cavité oro-pharyngée puis larynx et trachée. L'air inspiré y est alors réchauffé et humidifié, afin de permettre la dissolution des gaz pour les échanges ultérieurs avec le compartiment sanguin. Il y est également purifié de particules potentiellement dangereuses telles que des poussières ou microorganismes pathogènes.

La qualité de l'air inspiré continue d'être optimisée (humidification, épuration) *via* sa conduction dans les voies aériennes inférieures. Ces dernières sont constituées des bronches et, au sein des poumons, des bronchioles puis enfin des alvéoles où le dioxygène (O_2) diffuse dans le sang et où le dioxyde de carbone (CO_2) sanguin est relargué : c'est l'hématose.

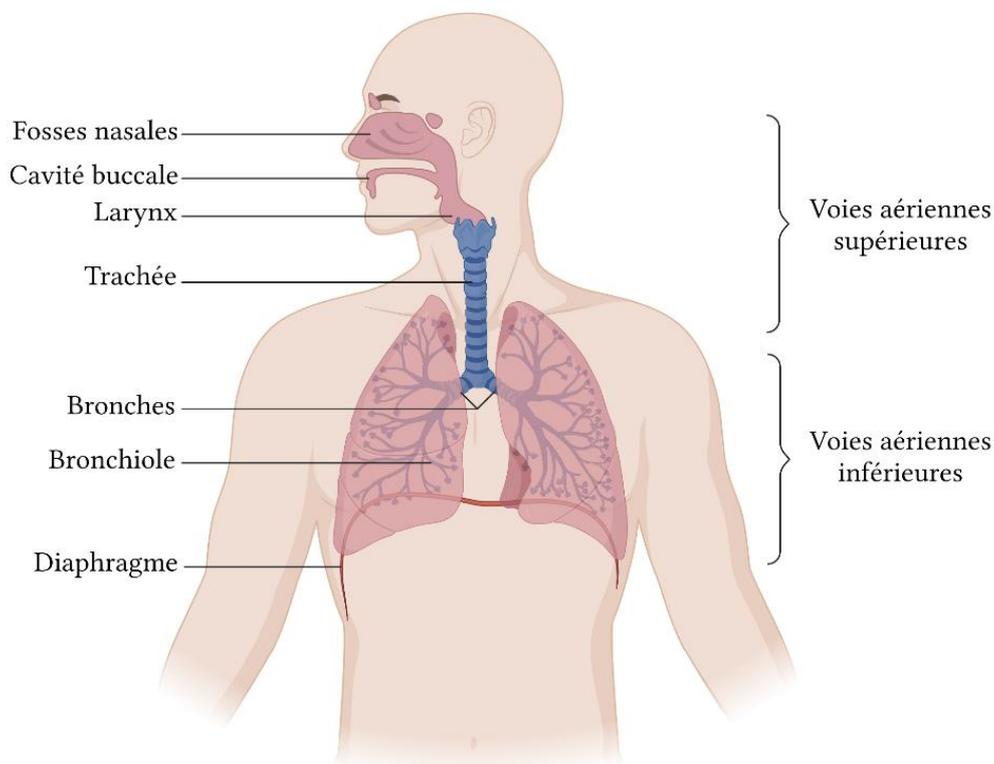


Figure 1. Le système respiratoire humain.

II- Épithélium des voies aériennes

Un épithélium est un tissu recouvrant toute partie de l'organisme se trouvant au contact du milieu extérieur. Ainsi, il peut recouvrir la peau, mais également toute cavité interne de l'organisme telles que le système digestif, urinaire, reproducteur ou encore respiratoire. Ce type de tissu est formé d'une ou plusieurs couches de cellules juxtaposées et jointives, permettant une étanchéité entre le milieu extérieur et le tissu sous-jacent. L'épithélium est ainsi souvent assimilé à une véritable barrière physique contre le passage d'éléments pathogènes ou non¹.

La proportion de chaque type cellulaire et la configuration de l'épithélium varie tout au long du tractus respiratoire (**Figure 2**). De manière simplifiée, un épithélium pluri-stratifié, squameux et kératinisé recouvre les fosses nasales. De la trachée aux bronches, l'épithélium est dit pseudo-stratifié : la totalité des cellules repose sur la lame basale mais ne sont pas toutes au contact de la lumière. Dans cette portion des voies aériennes, l'épithélium est principalement constitué de cellules ciliées, de cellules caliciformes et de cellules basales. Au niveau des bronchioles proximales, on observe au sein de l'épithélium pseudo-stratifié l'apparition des cellules club tandis que les cellules basales se raréfient. Pour finir, les bronchioles distales sont couvertes d'un épithélium cuboïde simple composé de cellules club.

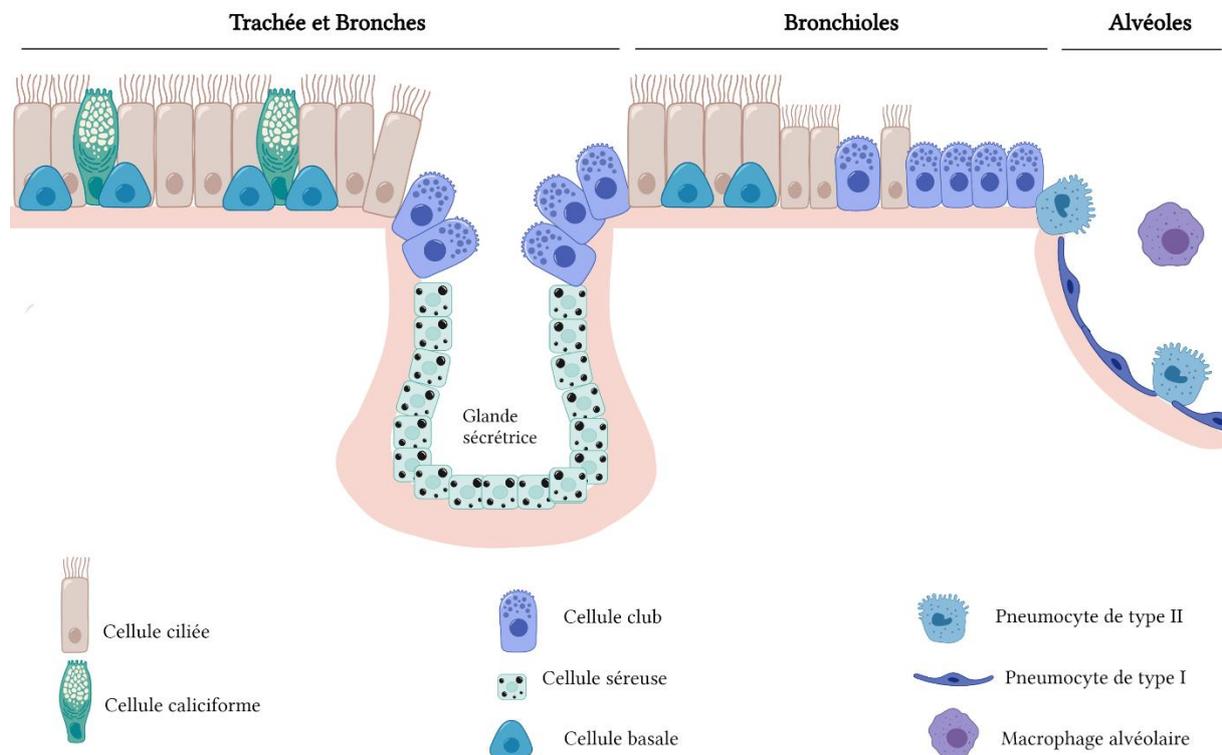


Figure 2. Les différents types cellulaires présents de la trachée aux alvéoles. Adapté de Antunes *et al.*, 2013². Par simplification et manque de données dans la littérature, les ionocytes, cellules M, à touffe, *hillock* et PNEC ne figurent pas sur ce schéma.

L'épithélium des voies aériennes est ainsi composé d'une grande variété de cellules, récemment décrite en détails par Davis et Wypych ³, comprenant les cellules basales, les cellules club, les cellules ciliées, les cellules caliciformes mais aussi les cellules neuroendocrines, les cellules à touffe, les ionocytes, les cellules micropliées ou encore les cellules en collines (**Figures 2 et 3**). Il s'agit ici d'une liste non exhaustive, car de très nombreux types cellulaires pulmonaires commencent tout juste à être découverts par séquençage des ARNm en cellule unique (*scRNA seq*). Travaglini *et al.*, ont par exemple identifié, en 2020, 58 populations cellulaires dans le poumon humain, dont 14 inconnues jusqu'à lors ⁴.

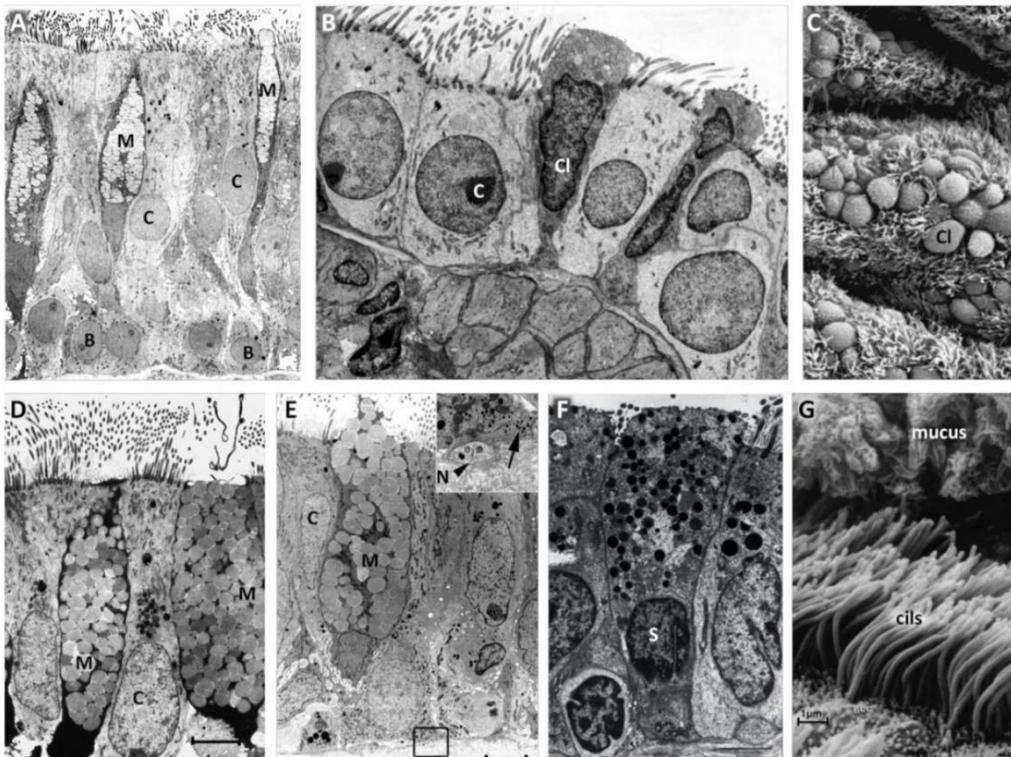


Figure 3. Microphotographies des différents types cellulaires épithéliaux des voies aériennes obtenues par microscopie électronique à transmission ou à balayage pour les images C et G : cellules ciliées (C), basales (B), à mucus (M), séreuses (S), club (Cl) et neuroendocrines (N) - Combinaison de microphotographies extraites de la thèse de Dre. Pauline Bardin (2019 | <http://www.theses.fr/2019SORUS046>); extraites de Bérubé *et al.*, 2010⁵; Gibson, 2002⁶; Jeffery and Li⁷, 1997; Moran, 1988⁸; Ross, 2006⁹).

a. Les cellules basales

Les cellules basales sont de forme cuboïde, fixées à la membrane basale ¹⁰ (**Figures 2 et 3**). Ces cellules représentent environ 5 à 30 % des cellules épithéliales des voies aériennes chez l'homme, en fonction de leur emplacement le long du tractus respiratoire ¹¹. Les cellules basales sont des acteurs clés de l'homéostasie respiratoire et de la régénération épithéliale ¹². En effet, les cellules basales sont les principales cellules souches des voies respiratoires. Elles ont

la capacité de s'auto-renouveler lors d'une lésion ainsi que de se différencier en cellules caliciformes, cellules ciliées, cellules à touffe, cellules neuroendocrines pulmonaires (PNEC, pour *pulmonary neuroendocrine cells*) ou encore en ionocytes pulmonaires¹¹⁻¹⁴. De nombreuses études ont suggéré qu'au moins deux sous-populations distinctes sur le plan transcriptionnel sont présentes parmi les cellules basales des voies respiratoires humaines^{4,10} et murines¹⁵. Une des deux sous-populations serait composée de cellules souches, tandis que la seconde serait composée de cellules progénitrices permettant la différenciation luminale¹⁶.

b. Les cellules club

Précédemment connues sous le nom de cellules de Clara, ces cellules en forme de dôme (**Figures 2 et 3**) sont les cellules épithéliales majoritairement retrouvées au niveau des bronchioles¹⁷. Les cellules club, ainsi que leurs produits sécrétés, jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie pulmonaire. Comme les cellules basales, elles peuvent agir comme des cellules souches, c'est-à-dire contribuer à la réparation de l'épithélium¹⁸ et donner naissance à des cellules ciliées et à des cellules caliciformes. Les cellules club ont également la capacité de se dédifférencier en cellules basales lorsque survient, par exemple, une lésion ou une perte de cellules basales^{19,20}. Les cellules club ont également un rôle de cellules sécrétrices, participant à la production du liquide de surface des voies respiratoires²¹⁻²³.

c. Les cellules ciliées

Les cellules ciliées, de forme cylindrique (**Figures 2 et 3**), sont présentes tout du long des voies respiratoires. Au moins deux sous-ensembles distincts sur le plan transcriptionnel ont été identifiés par *scRNAseq* entre les parties proximales et distales du tractus respiratoire⁴. Les cellules ciliées proviennent de la différenciation de cellules club ou des cellules caliciformes²⁴. Elles jouent un rôle central dans l'homéostasie des voies respiratoires. En effet, les cellules ciliées permettent l'élimination par expectoration des micro-organismes pathogènes, de particules inhalées ainsi que d'autres débris piégés dans le mucus, grâce au battement rythmique et asynchrone des cils présents au pôle apical. Ce processus est communément appelé clairance mucociliaire²⁵, et est altéré dans le cas de pathologies pulmonaires telles que la mucoviscidose.

d. Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes (ou *goblet cells*), ainsi nommées de par leur aspect (**Figures 2 et 3**), sont les principales cellules productrices de mucus des voies respiratoires. Elles permettent ainsi, de concert avec les cellules ciliées, de faciliter l'efficacité de la clairance mucociliaire. Le mucus est composé d'électrolytes, de métabolites, fluides, produits antimicrobiens

et de mucines associées aux cellules, sécrétées ou gélifiantes, telles que MUC5AC et MUC5B²⁶. Comme les cellules ciliées, les cellules caliciformes sont dérivées des cellules club. La lignée des cellules caliciformes a récemment été divisée en deux sous-ensembles fonctionnellement différents : d'une part, les cellules gobelet-1 produisent principalement du mucus ; d'autre part, les cellules gobelet-2 sécrètent des orthologues de la protéine 16 du granule de zymogène, une protéine capable de se lier aux bactéries Gram-positives et de les agréger^{13,27}.

La dérégulation de la production de mucus par les cellules caliciformes est une des caractéristiques de diverses pathologies pulmonaires, dont la mucoviscidose^{26,28}. Par exemple, la surproduction de MUC5AC peut provoquer une hyperréactivité allergique des voies respiratoires²⁹, tandis que l'absence de MUC5B peut entraîner une altération de la clairance muco-ciliaire caractérisée par une inflammation persistante, une infection bactérienne chronique et des schémas respiratoires atypiques³⁰.

e. Les cellules neuroendocrines pulmonaires

Les PNEC sont des cellules résidentes épithéliales innervées très rares (**Figure 3**). Sensibles à l'hypoxie, l'hypercapnie et à la nicotine^{31,32}, elles détectent l'activité des voies respiratoires et sécrètent des neuropeptides permettant entre autres de stimuler les réponses immunitaires³³. Ainsi, elles font le lien entre les systèmes immunitaire et nerveux. Les PNEC auraient également un rôle important dans le développement pulmonaire fœtal³⁴. On estime que ces cellules représentent environ 0,5 % de toutes les cellules épithéliales des voies respiratoires humaines³⁵ et 0,01 % de toutes les cellules du poumon⁴. Les PNEC existent souvent sous forme de cellules isolées, mais peuvent également former des amas appelés corps neuroépithéliaux^{36,37}. Il a récemment été suggéré qu'elles provenaient de cellules à touffe³⁸. Comme pour les cellules basales et les cellules club, les lésions épithéliales peuvent déclencher la reprogrammation d'un sous-ensemble de PNEC et leur faire adopter d'autres statuts cellulaires, agissant ainsi comme des cellules souches et facilitant la réparation des tissus^{39,40}. Une augmentation du nombre de PNEC peut être détectée dans des pathologies pulmonaires comme la mucoviscidose⁴¹.

f. Les cellules à touffe ou tuft cells

Les cellules à touffe auraient des fonctions chimiosensorielles, neuronales et immunologiques⁴². Elles sont retrouvées au niveau des voies respiratoires¹³, mais également dans l'estomac⁴³, les intestins⁴², l'épithélium olfactif⁴⁴, le tube auditif⁴⁵, la conjonctive⁴⁶, le canal biliaire⁴⁷, la vésicule biliaire^{48,49}, l'urètre^{50,51}, et même le thymus⁵², et seraient désignées

par une variété de noms différents en fonction de leur emplacement anatomique. Dans l'intestin humain, il a été démontré que les cellules à touffe résident à proximité des fibres nerveuses⁵³. Des observations analogues ont été faites dans le canal auditif et la conjonctive^{45,46,54}, désignant ainsi les cellules à touffe comme des médiateurs potentiels de la communication immuno-neuronale. Néanmoins, une colocalisation similaire dans les voies respiratoires reste à décrire. Des recherches récentes ont révélé l'existence de plusieurs sous-ensembles de cellules à touffe résidant dans les voies respiratoires murines, appelées cellules à touffe immatures, tuft-1 et tuft-2¹³. Les cellules tuft-1 provenant de trachée de souris expriment ainsi des gènes liés à la signalisation du goût, tandis que les cellules tuft-2 expriment des gènes associés à la synthèse des leucotriènes et à l'immunomodulation tels que le gène *Alox5ap*¹³. Ces données suggèrent que les premières ont un rôle chimiosensoriel, tandis que les secondes ont une fonction plus immunologique¹³. Néanmoins, les preuves de l'implication des cellules à touffe dans les maladies respiratoires sont limitées. Ces cellules expriment des récepteurs TAS2⁵⁵, qui permettent l'atténuation de l'inflammation allergique des voies respiratoires⁵⁶. Des cellules à touffe ont également été retrouvées de manière ectopique dans des voies aériennes murines distales après une infection par le virus de la grippe, contribuant ainsi au remodelage dysplasique⁵⁷. Les cellules à touffe pourraient également servir de progéniteurs pour les PNEC et les ionocytes pulmonaires³⁸.

g. Les cellules en collines ou hillock cells

Très peu d'éléments sont à ce jour connus concernant les cellules en collines. Pouvant être confondues avec des axones, elles ont été décrites par Montoro *et al.* comme une variété de cellules club descendant de la lignée des cellules basales et exprimant la kératine 13¹³. Ces cellules se trouvent dans des groupes contigus de cellules épithéliales stratifiées, formant des structures « en colline », où elles ont un taux de renouvellement particulièrement élevé et expriment des marqueurs associés à la différenciation de l'épithélium pavimenteux, à l'adhésion cellulaire et à l'immunomodulation^{13,58}.

h. Les cellules micro-pliées ou cellules M

Comme les cellules à touffe, les cellules M sont mieux comprises dans un contexte gastro-intestinal, où leur principale fonction est l'initiation des réponses immunitaires par endocytose et le transport d'antigènes de la lumière intestinale vers les cellules présentatrices d'antigènes résidant dans la lamina propria⁵⁹. Néanmoins, on peut également trouver des cellules M dans d'autres sites muqueux, tels que les voies respiratoires de l'homme et de la souris, où elles sont structurellement et fonctionnellement similaires à celles de l'intestin^{60,61}.

Les cellules M des voies respiratoires auraient un rôle assez large dans l'infection bactérienne. En effet, les cellules M sont la cible de *Mycobacterium tuberculosis* (ou bacille de Koch), qui utilise ces cellules afin de faciliter sa propagation⁶². D'autre part, les cellules M sont également des cellules présentatrices d'antigènes : elles sont capables entre autres d'absorber les antigènes de *Salmonella typhimurium* et de *Streptococcus*⁶¹.

i. Les cellules séreuses

Les cellules séreuses sont des cellules d'aspect pyramidal (**Figures 2 et 3**), composant les glandes localisées au sein de l'épithélium des voies aériennes, de manière plus distale que les cellules à mucus^{63,64}. En plus de la sécrétion de fluides et de solutés⁶⁵, les cellules séreuses sont capables de sécréter des composants antimicrobiens, tels que de la lactoferrine ou des lysozymes⁶⁶⁻⁶⁹, leur valant le surnom de « neutrophiles immobiles »⁷⁰.

j. Les pneumocytes

Les échanges gazeux sont favorisés par les différents types cellulaires présents dans les alvéoles et les propriétés physico-chimiques spécifiques de ce micro-environnement (**Figure 4**). En effet, la forme des pneumocytes de type I, cellules très fines *et allongées* occupant près de 96 % de la surface alvéolaire⁷¹, permet la diffusion des gaz entre les sacs alvéolaires et les capillaires sanguins localisés dans la paroi alvéolaire (<https://medlineplus.gov/ency/anatomyvideos/000059.htm>). Les pneumocytes de type II représentent quant à eux près de 4 % de la surface alvéolaire⁷¹. De forme cuboïdale, ils sont responsables de la synthèse du surfactant, dont les propriétés tensio-actives sont nécessaires afin d'éviter un collapsus des alvéoles lors de la phase d'expiration. Les pneumocytes de type II présentent des caractéristiques de cellules souches de par leur capacité d'auto-renouvellement ainsi que de transdifférenciation en pneumocytes de type I⁷².

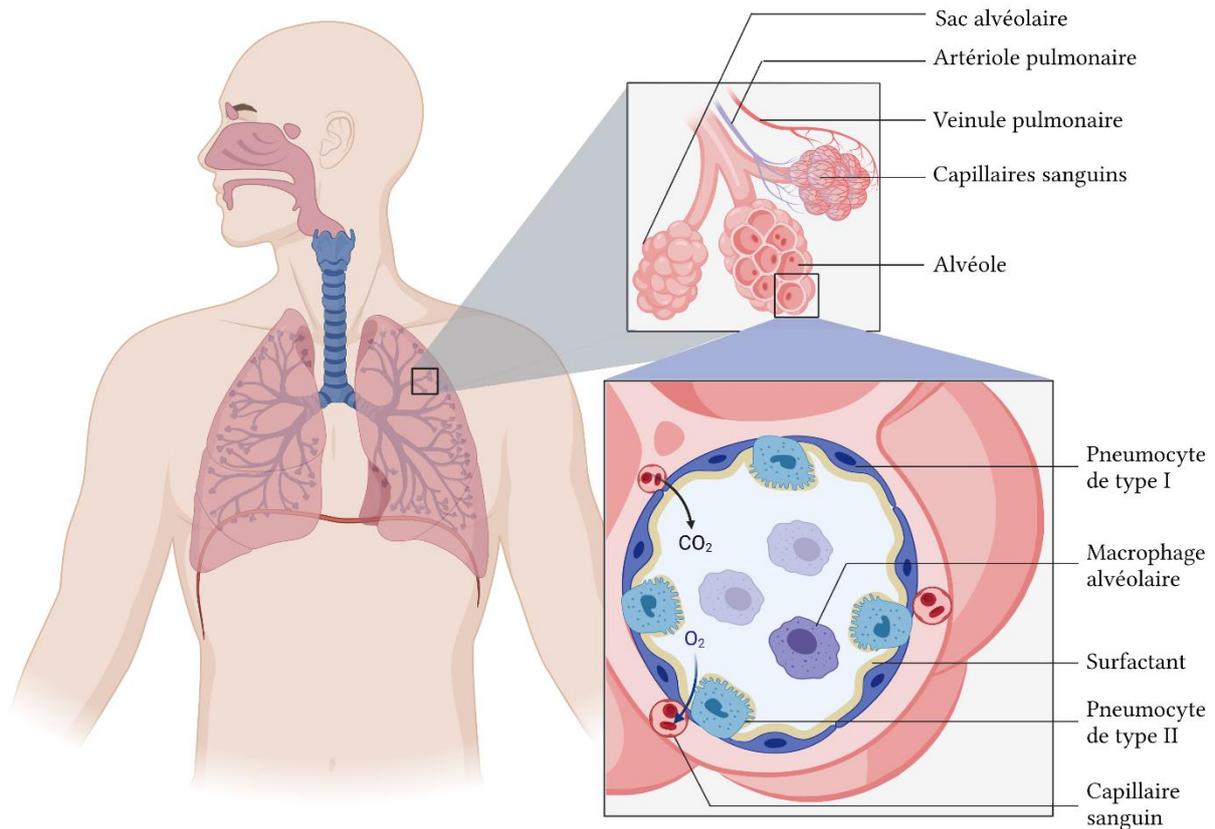


Figure 4. Structure et composition des espaces alvéolaires.

k. Les ionocytes

Le développement de nouvelles technologies a pu permettre l'identification récente d'un nouveau type cellulaire au niveau des voies aériennes : les ionocytes pulmonaires (**Figure 5**). Deux études distinctes ont ainsi identifié ce type cellulaire dans les voies respiratoires des souris (trachée) et des humains (bronches) ^{13,73} par combinaison de scRNAseq et de traçage de lignée cellulaire (*lineage tracing*) *in vivo*. Générés à partir de précurseurs de cellules basales ou de cellules à touffe ³⁸, les ionocytes pulmonaires représentent environ 2 % des cellules épithéliales des voies aériennes humaines et expriment des niveaux élevés du gène responsable de la mucoviscidose, le gène *Cystic fibrosis transmembrane regulator* (*CFTR*) (**Figure 5**) ^{13,73}. De manière anecdotique, les ionocytes ont été ainsi nommés de par leur similarité avec les cellules éponymes présentes dans la peau de larve de xénope ⁷⁴ et de poisson-zèbre ⁷⁵, qui permettent des efflux chlorure entre le milieu marin et la circulation sanguine. Ainsi, les ionocytes pulmonaires humains, exprimant fortement la protéine CFTR, semblent être une cible intéressante pour de futurs traitements visant à soigner la mucoviscidose. En effet, bien que ne représentant qu'environ 0,5 % des cellules épithéliales des voies respiratoires murines, les ionocytes expriment près de 55 % du total des transcrits *Cftr* détectés dans l'épithélium trachéal

de souris ¹³. L'expression de *CFTR* dans le tissu bronchique humain est régulée par le facteur de transcription FOXI1, autre marqueur important des ionocytes pulmonaires. Les souris déficientes pour *Foxi1* présentent une réduction marquée de l'expression de la protéine CFTR et une perturbation de la physiologie du mucus des voies respiratoires ¹³. Ces données suggèrent ainsi un lien de causalité entre le dérèglement des ionocytes pulmonaires et le développement de la mucoviscidose.

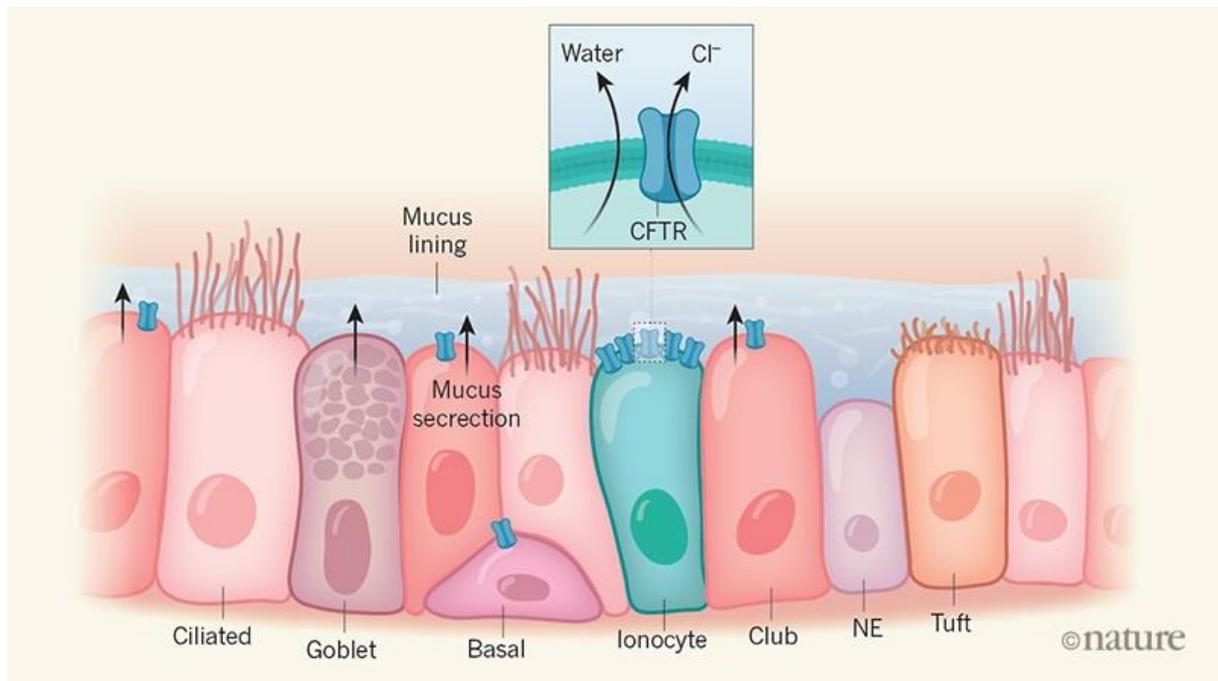


Figure 5. Diversité des types cellulaires présents dans l'épithélium trachéal de souris et expression de la protéine CFTR. Extrait de Travaglini et Krasnow, 2018⁷⁶.

L'élimination des éléments potentiellement pathogènes présents dans l'air inspiré est rendue possible par divers éléments. Tout d'abord, l'étanchéité des épithelia empêche les particules et microorganismes pathogènes d'accéder aux tissus sous-jacents. Ensuite, la production de mucus par les cellules caliciformes, majoritairement présentes au niveau bronchique, permet à la fois de piéger les particules et microorganismes aéroportés mais aussi de limiter leur prolifération grâce aux agents antibactériens présents dans le mucus ⁷⁷. D'autre part, des réflexes nerveux induisent des bronchoconstrictions ou une toux, qui, associés à la clairance mucociliaire, permettent la mise en mouvement et l'élimination du liquide de surface et du mucus contenant particules et microorganismes⁷⁸.

D'autre part, la présence dans le mucus d'acteurs protéiques tels que des lysozymes, de la lactoferrine, des immunoglobulines ou encore des peptides anti-microbiens tels que les défensines, permet de lutter contre divers microorganismes pathogènes⁷⁹⁻⁸³.

L'épithélium bronchique et la clairance mucociliaire jouent ainsi le rôle de première défense de l'appareil respiratoire. Leur intégrité et leur bon fonctionnement sont essentiels pour faire face à des infections bactériennes ou fongiques et conserver une fonction respiratoire normale. Ces paramètres sont modifiés dans certaines pathologies telle que la mucoviscidose, que nous allons étudier dans le cadre de cette étude.

Chapitre 2 - La mucoviscidose

I- Épidémiologie

La mucoviscidose (ou CF, pour *cystic fibrosis*) est la maladie génétique rare et mortelle la plus fréquente au sein de la population caucasienne⁸⁴. En France, près de deux millions de personnes sont porteuses d'un variant génétique responsable de la maladie tandis que l'on estime qu'un bébé atteint de la mucoviscidose naît tous les 3 jours. En effet, 109 naissances de patients atteints de mucoviscidose ont été recensées en 2019 d'après le bilan des données 2019 du registre français de la mucoviscidose 2021. Le nombre de patients est estimé à près de 70 000 dans le monde, d'après le registre américain *Cystic Fibrosis Foundation*, avec une prévalence variable selon les régions du monde (**Figure 6**).

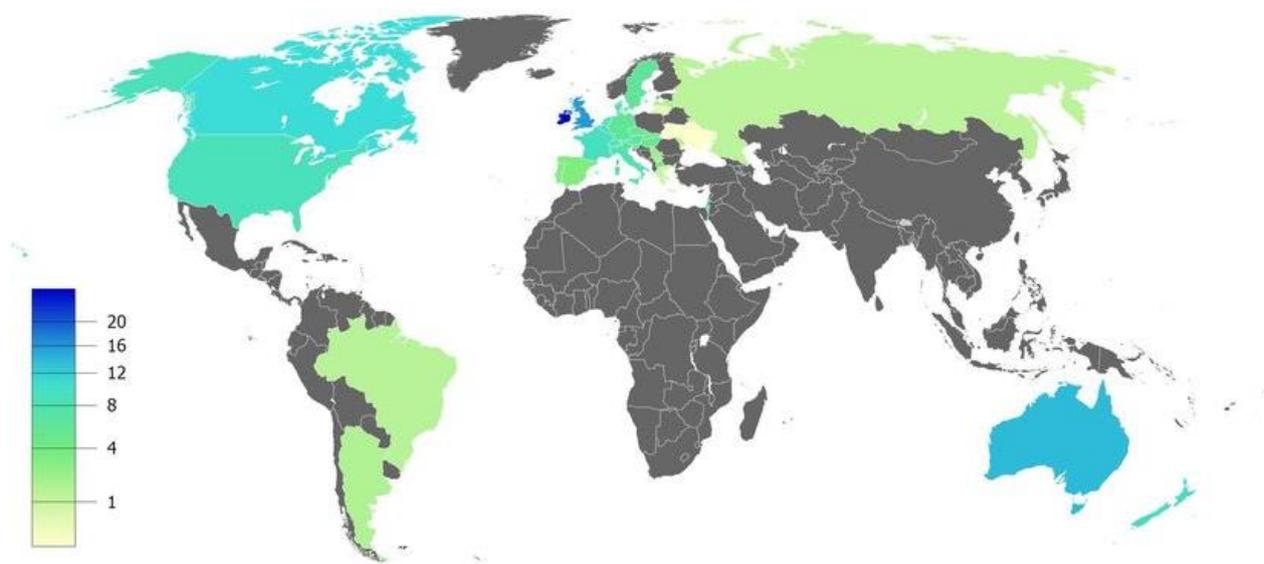


Figure 6. Prévalence de la mucoviscidose dans le monde. D'après la compilation de Lopes-Pacheco, 2016⁸⁵ faite à partir de données provenant de *Cystic Fibrosis Foundation (CFF)*, *European Cystic Fibrosis Society (ECFS)*, *Cystic Fibrosis Canada (CFC)*, *Cystic Fibrosis Federation Australia (CFFA)* et de *Brazilian Cystic Fibrosis Study Group (GBEFC)*, graduation chiffrée pour 100 000 habitants. Les zones grisées représentent les zones géographiques pour lesquelles des données fiables ne sont pas disponibles.

En 2019, le taux brut de mortalité en France s'élevait à 5,7 pour 1000 patients, avec un âge médian au décès de 34 ans. Une analyse de survie a été réalisée sur cinq cohortes de patients nés à des périodes différentes (1992-1996 ; 1997-2001 ; 2002-2006 ; 2007-2011 ; 2012-2016) et a pu mettre en évidence une amélioration de l'espérance de vie des patients appartenant aux plus jeunes cohortes comparées aux cohortes plus âgées (bilan des données 2019 du registre français de la mucoviscidose 2021). Cette étude a ainsi permis de montrer une différence significative de survie dès l'âge de 9 ans entre la cohorte née durant la période 1992-1996 et celle née durant la période 1997-2001. Cette amélioration des taux de survie observés ces dernières années est en grande partie due au développement de la prise en charge des patients

et des thérapies. Néanmoins, il n'existe à ce jour aucun traitement curatif universel et les patients décèdent toujours des suites d'une insuffisance respiratoire.

La mucoviscidose est caractérisée par une transmission autosomique et récessive de variants pathogènes du gène *CFTR*, identifié simultanément par plusieurs laboratoires en 1989⁸⁶⁻⁸⁸. Le gène *CFTR* est localisé sur le bras long du chromosome 7 en position 7q31 et code pour une protéine responsable des échanges hydriques et ioniques à la surface des épithéliums sécréteurs. Plus précisément, cette protéine membranaire de 1480 acides aminés permet de réaliser des efflux d'ions chlorure au niveau des muqueuses de nombreux organes tels que les poumons, les intestins, le foie, le pancréas, les glandes sudoripares ou les organes génitaux⁸⁹. L'atteinte respiratoire étant la principale cause de mortalité et de morbidité des patients, nous nous intéresserons plus particulièrement au niveau pulmonaire.

Un dysfonctionnement - ou une absence - du canal CFTR induit des déséquilibres iono-hydriques responsables d'une déshydratation du liquide de surface et du mucus sécrété à la surface de l'épithélium. Ces déséquilibres, dus aux variants pathogènes du gène *CFTR*, provoquent un épaissement et une augmentation de la viscosité du mucus. Une obstruction est alors observée dans différents organes.

II- Le gène *Cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR)* et ses variants

A ce jour, plus de 2000 variants pathogènes du gène *CFTR* ont été répertoriés. La conséquence au niveau protéique la plus fréquemment observée est la délétion de la phénylalanine en position 508 (F508del) dont au moins une copie est présente chez plus de 80 % des patients atteints de mucoviscidose. Les multiples autres variants du gène *CFTR* – et donc de la protéine CFTR - ne représentent ainsi chacun qu'une minorité de patients (bilan des données 2019 du registre français de la mucoviscidose 2021) (**Table 1**), pour qui de possibles traitements sont très peu développés.

<i>Variant génétique</i>	<i>Variant protéique</i>	<i>Nom usuel du variant génétique et/ou protéique</i>	<i>Type de mutation</i>	<i>Nombre de patients*</i>	<i>Proportion (en %)</i>
c.1521_1523delCTT	p.Phe508del	F508del	Délétion d'un codon	5957	83,2
c.1624G>T	p.Gly542X	G542X	Non-sens	398	5,6
c.3909C>G	p.Asn1303Lys	N1303K	Faux-sens	296	4,1
c.2657+5G>A (AJ574995.1:g.216G>A)	/	2789+5G>A	Epissage (intron)	187	2,6
c.1585-1G>A (AJ574980.1:g.116G>A)	/	1717-1G>A	Epissage (intron)	151	2,1
c.350G>A	p.Arg117His	R117H	Faux-sens	146	2,0
c.1657C>T	p.Arg553X	R553X	Non-sens	132	1,8
c.1652G>A	p.Gly551Asp	G551D	Faux-sens	127	1,8
c.3846G>A	p.Trp1282X	W1282X	Non-sens	108	1,5
c.3718-2477C>T (AY848832.1:g.40725C>T)	/	3849+10kbC>T	Autre	103	1,4

* Avec au moins une copie du gène considéré

Table 1. Les 10 variants du gène *CFTR* les plus fréquents chez les patients atteints de mucoviscidose français en 2019. (Données extraites du bilan des données 2019 du registre français de la mucoviscidose 2021 et de Ogino *et al.*, 2007⁹⁰)

/!\ Par la suite, les noms usuels seront utilisés pour faire référence aux variants génétiques de *CFTR*, provoquant ou non la formation d'un variant protéique.

La multitude de variants pathogènes de *CFTR* sont aujourd'hui classifiés en 6 classes (**Figure 7**), en fonction de la conséquence fonctionnelle du variant concerné⁹¹⁻⁹⁴. Les variants de classes I à III sont considérés comme provoquant un phénotype plus sévère que les variants de classes IV à VI.

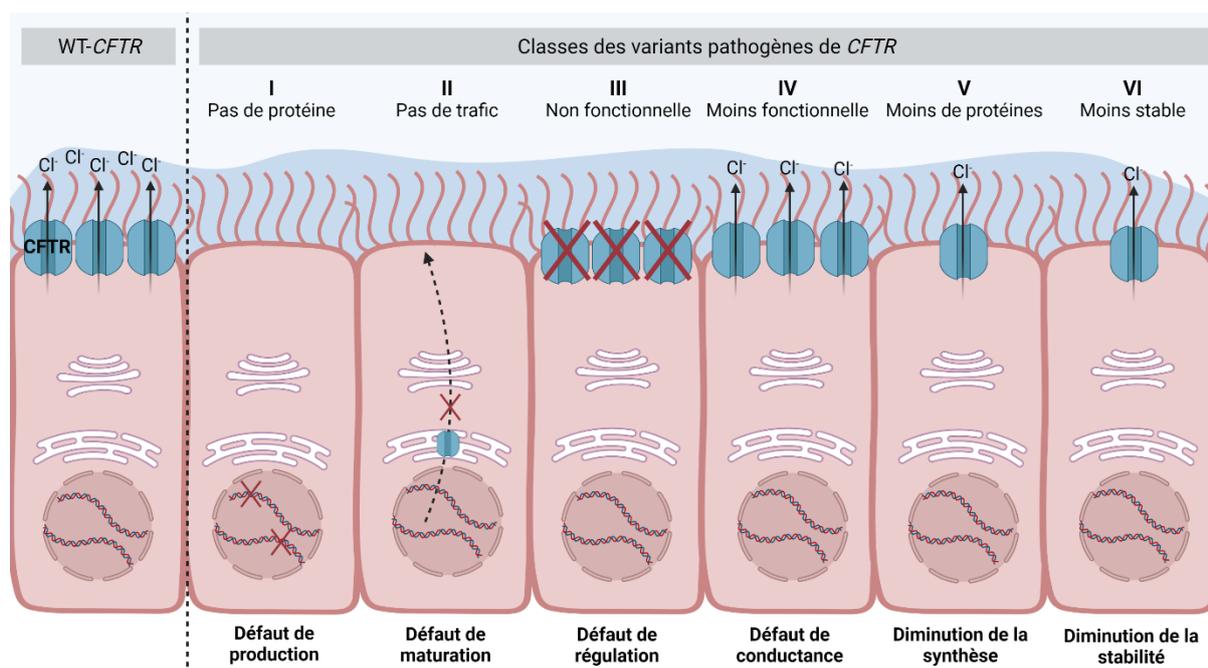


Figure 7. Représentation des différentes classes de variants du gène *CFTR* et de leur impact sur l'expression et/ou la localisation de la protéine. Adapté de Boyle and De Boeck, 2013⁹⁵

a. *Les variants de classe I*

La classe I est composée de variants de *CFTR*, tels que G542X, induisant la présence d'un codon stop prématuré dans la séquence codante de *CFTR*. Il s'agit d'une mutation « non-sens ». La protéine traduite est alors tronquée et très vite dégradée. Ce type de variant est présent chez 15,7 % des patients mucoviscidosiques français d'après le bilan des données 2019 du registre français de la mucoviscidose 2021.

b. *Les variants de classe II*

Les variants de classe II sont caractérisés par un défaut de maturation de la protéine CFTR qui s'accumule alors au niveau du réticulum endoplasmique (RE) au lieu d'être transférée à l'appareil de Golgi puis adressée à la membrane plasmique. La protéine non maturée est redirigée et dégradée par le protéasome. Cette classe est la plus représentée chez les patients atteints de mucoviscidose, avec par exemple le variant F508del, qui est retrouvé en au moins une copie chez plus de 80 % des patients en France. Plus précisément, 41 % des patients mucoviscidosiques français sont homozygotes pour le variant F508del et près de 42 % sont hétérozygotes (bilan des données 2019 du registre français de la mucoviscidose 2021).

c. *Les variants de classe III*

Dans le cas des variants de classe III, la protéine CFTR est bien fabriquée et adressée à la membrane plasmique mais les domaines NBD1 et NBD2 (*nucleotide-binding domain 1* ou

2), qui permettent la régulation de l'ouverture du canal CFTR *via* la fixation de molécules d'ATP, sont affectés. Le canal est alors présent mais incapable de s'ouvrir et donc non fonctionnel. C'est notamment le cas pour le variant G551D, présente chez près de 2 % des patients atteints de mucoviscidose français.

d. Les variants de classe IV

Les variants de classe IV sont caractérisés par un défaut de conductance du canal CFTR. Ainsi, la protéine est bien fabriquée, adressée à la membrane avec une bonne stabilité, mais son efficacité concernant les efflux chlorures est diminuée, comme par exemple pour le variant R117H, présent en au moins une copie chez 2 % des patients français.

e. Les variants de classe V

La classe V est composée de variants, tels que A455E, responsables d'une instabilité de l'ARNm de *CFTR*. Les quantités de protéines CFTR traduites sont donc réduites, bien que bien formées et adressées à la membrane. Le variant A455E est présent chez 0,7 % des patients français.

f. Les variants de classe VI

Dans le cas de la classe VI, la protéine CFTR est formée et est bien adressée à la membrane mais est très peu stable et est internalisée rapidement puis dégradée par le protéasome. Des variants tels que Q1412X ou 4326delTC, responsables de la production d'une protéine tronquée, font partie de cette classe.

III- Dépistage et diagnostic

Différents éléments peuvent fréquemment amener à un dépistage de la mucoviscidose : des antécédents familiaux, une diarrhée chronique, un iléus méconial (IM) - ou obstruction intestinale à la naissance - un retard de croissance ou des symptômes respiratoires (<https://www.vaincrelamuco.org/vivre-avec/la-mucoviscidose/symptomes-depistage-et-diagnostic> ; <https://www.ameli.fr/assure/sante/themes/mucoviscidose/diagnostic-evolution>).

Depuis 2002 en France, un dépistage néonatal systématique est réalisé sur les nouveau-nés trois jours après leur naissance. Ce dépistage consiste en la récupération d'une goutte de sang prélevée au niveau du talon à l'aide d'un papier buvard : c'est le test de Guthrie ⁹⁶. Dans ce prélèvement est dosée la trypsine immuno-réactive (ou TIR). Une trop grande quantité de cette enzyme reflète une anomalie pancréatique, ayant lieu durant la vie fœtale ou dans les

premiers mois de vie et pouvant être due à la mucoviscidose. Cette technique permet d'identifier près de 95 % des patients atteints de la maladie. Néanmoins, certains patients portent des variants génétiques de *CFTR* qui ne provoquent pas d'insuffisance pancréatique et ne seront pas identifiés par ce dosage. De même, une TIR trop élevée peut être signe d'une pathologie autre que celle de la mucoviscidose.

Pour confirmer - ou infirmer - le diagnostic de mucoviscidose, une analyse génétique est réalisée avec l'accord parental grâce à une prise de sang permettant de rechercher les 29 variants génétiques les plus fréquents de *CFTR* (dix d'entre eux sont répertoriés dans la **Table 1**). Après cette analyse, plusieurs cas peuvent se présenter :

- *Deux variants pathogènes sont identifiés :*

Les parents et leur nouveau-né sont convoqués au sein du Centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose (CRCM) le plus proche. Il en existe une trentaine en France. Sont alors établis une évaluation clinique et un test de la sueur. L'évaluation clinique permet de vérifier si l'enfant présente différents symptômes caractéristiques de la mucoviscidose, ces derniers seront détaillés dans les paragraphes suivants. Le test de la sueur est le dernier et le plus ancien élément permettant de confirmer le diagnostic. En effet, cette méthode a été établie par di Sant'Angnese en 1953 ⁹⁷ et standardisé par Gibson et Cooke en 1959 ⁹⁸. Le principe consiste à récolter la sueur de l'enfant et à mesurer ses concentrations en ions chlorures, qui est anormalement élevée chez les patients atteints de mucoviscidose. Si la concentration en ions chlorures est supérieure à 60 mmol/L, le diagnostic est confirmé. Si elle est inférieure à 40 mmol/L le diagnostic est au contraire infirmé. Dans le cas où la concentration en chlore sudoral est comprise entre 40 et 60 mmol/L, le diagnostic repose sur l'analyse clinique. Le traitement et un suivi sont mis en place par le CRCM si le diagnostic est bien confirmé.

- *Un seul variant pathogène est identifié :*

Le test de la sueur est réalisé et, comme pour le cas précédent, si les concentrations de chlore sudorales dépassent le seuil de 60 mmol/L, le patient est diagnostiqué et pris en charge par le CRCM. La conclusion vis-à-vis des concentrations « intermédiaires » dépend encore dans ce cas des données cliniques. Si le test de la sueur est négatif, le patient n'est pas considéré comme étant atteint de la mucoviscidose mais comme étant porteur d'un allèle pouvant transmettre la maladie à sa descendance. Cette information est donnée aux parents lors d'une consultation de conseil génétique.

- *Aucun variant pathogène n'est retrouvé :*

Le dosage de la TIR est répété sur le patient à l'âge de 21 jours. Si elle est toujours élevée, le test de la sueur est réalisé et permet de conclure sur l'atteinte ou non de la mucoviscidose. Si les résultats du test de la sueur ne sont pas formels – concentrations « intermédiaires » - le test devra être répété.

IV- Symptômes et soins

Comme nous l'avons précisé précédemment, la mucoviscidose est caractérisée par des signes cliniques pouvant affecter différents organes et ce, dès la naissance ou bien tout au long de la vie du patient (**Table 2**).

a. Manifestations extra-pulmonaires

1. Atteintes digestives

a) Atteintes gastro-intestinales

Avant que le dépistage néonatal systématique soit mis en place, les atteintes digestives des patients atteints de mucoviscidose faisaient partie des signes cliniques pouvant annoncer la maladie. En effet, la plupart des patients présentent des atteintes digestives pouvant se manifester par des diarrhées graisseuses ou des constipations fréquentes, des troubles de la motilité gastro-intestinale pouvant entraîner un prolapsus rectal ou encore des reflux gastro-œsophagiens⁹⁹.

Chez 15 % des patients atteints de mucoviscidose, une occlusion intestinale apparaît dans les jours suivant la naissance due à l'accumulation de méconium desséché au niveau de la valvule iléo-caecale. Cette occlusion intestinale néonatale est appelée iléus méconial (IM) (**Figure 8**). Dans la moitié des cas, elle nécessite une intervention chirurgicale pouvant engager le pronostic vital du nouveau-né¹⁰⁰.

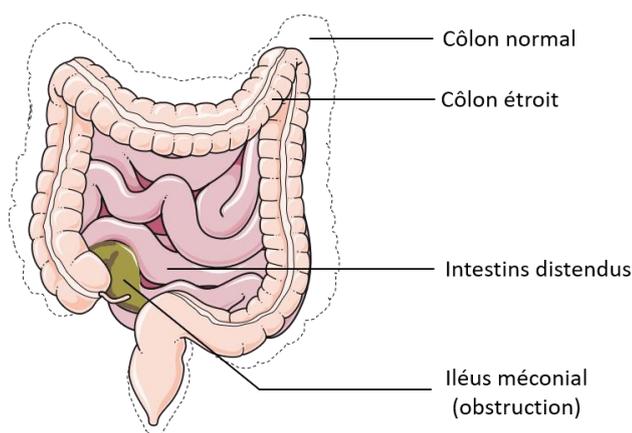


Figure 8. Représentation de l'iléus méconial présent chez une partie des patients atteints de mucoviscidose.

Les patients mucoviscidosiques sont également sujets à une malabsorption des nutriments par les entérocytes ainsi qu'à une augmentation de la perméabilité intestinale due à une stimulation du système immunitaire. Ce phénomène peut être associé à une intolérance aux protéines de lait de vache, une maladie cœliaque ou la maladie de Crohn¹⁰¹.

b) Atteinte pancréatique exocrine

Les patients porteurs de variants de *CFTR* « sévères », c'est-à-dire de classes I à III, sont caractérisés par une insuffisance pancréatique exocrine. Cela correspond à près de 80 % des nourrissons atteints de mucoviscidose. Environ 65 % des patients insuffisants pancréatiques sont identifiés au moment du diagnostic tandis que 15 % des nouveau-nés initialement suffisants deviennent insuffisants pancréatiques durant leur première année de vie¹⁰².

Concrètement, l'accumulation de mucus dans les canaux pancréatiques empêche la sécrétion d'enzymes essentielles à la digestion des graisses et des protéines, telles que la lipase, la trypsine et la chymotrypsine¹⁰³. Cela induit des carences nutritionnelles importantes chez les patients atteints de mucoviscidose, notamment en acides gras essentiels, vitamines, fer et oligo-éléments, un retard de croissance staturo-pondérale ainsi que des selles fréquentes, abondantes et grasses^{104,105}.

D'autre part, les enzymes non déversées sont retenues au sein du pancréas et provoquent une dégradation progressive des cellules des îlots de Langerhans. Cela induit une insuffisance pancréatique endocrine caractérisée par une insuffisance de sécrétion d'insuline ainsi qu'une résistance périphérique à cette hormone¹⁰⁶. On observe ainsi l'apparition d'un diabète appelé *cystic fibrosis-related diabetes mellitus* (CFRD), présentant à la fois des caractéristiques du diabète de type I et du diabète de type II.

c) Atteinte hépatobiliaire

L'atteinte hépato-biliaire (ou *cystic fibrosis liver disease* : CFLD) est la première cause de mortalité d'origine extra-pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose. De même que pour le mucus au niveau pulmonaire, la bile est asséchée, épaissie et plus visqueuse chez les patients, provoquant une obstruction des canaux hépato-biliaires. Cette obstruction peut induire une cholestase, définie comme une diminution ou un arrêt de la sécrétion biliaire, accompagnée le plus souvent d'une lithiase vésiculaire (formation de calculs biliaires), pouvant aboutir à une cirrhose. En effet, 5 à 10 % des patients mucoviscidosiques développent une cirrhose multilobulaire durant leurs 10 premières années de vie (**Figure 9**). La décennie suivante, la cirrhose s'accompagne d'une hypertension portale augmentant le risque d'hémorragie digestive¹⁰⁷. La fréquence et la gravité de l'atteinte hépatique diffère et augmente avec l'âge¹⁰⁸.

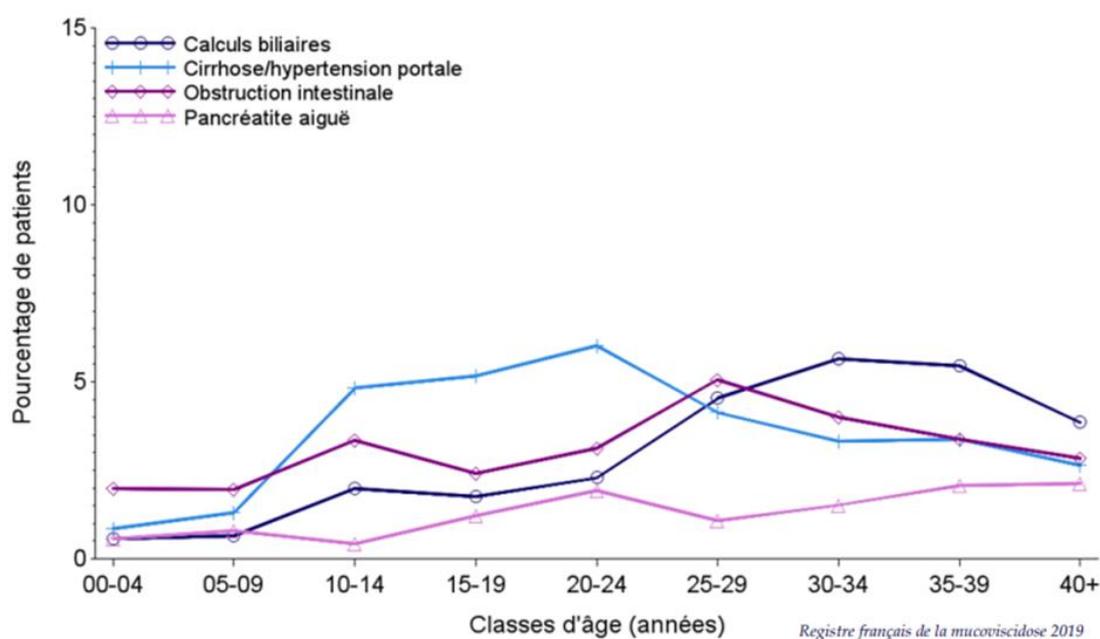


Figure 9. Evolution de la fréquence des différentes pathologies hépatiques et digestives au cours de la vie des patients atteints de mucoviscidose (bilan des données 2019 du registre français de la mucoviscidose 2021).

d) Soins et traitements des atteintes digestives

Les symptômes dus à l'atteinte digestive sont contrôlés tout d'abord en accompagnant le patient et en l'informant sur la nutrition. Les patients sont en effet généralement suivis par une diététicienne en charge d'adapter les apports nutritionnels des patients qui ont des besoins énergétiques très importants, des problèmes de mal digestion, de malabsorption, de croissance et parfois de perte d'appétit. L'apport calorique d'un enfant mucoviscidosique représente 120 à 130 % des apports nécessaires à un enfant sain du même âge selon l'association Vaincre la

Mucoviscidose (<https://www.vaincrelamuco.org/vivre-avec/la-mucoviscidose/symptomes-digestifs/nutrition>).

L'alimentation est complétée par un apport en vitamines A, D, E et K, en minéraux tels que le zinc, le sélénium ou le fer et parfois le sodium. L'administration médicamenteuse d'extraits pancréatiques permet de compenser la sécrétion défaillante des enzymes pancréatiques nécessaires à la digestion (<https://www.vaincrelamuco.org/vivre-avec/la-mucoviscidose/symptomes-digestifs/nutrition>).

En ce qui concerne les complications dues à l'atteinte hépato-biliaire, un dépistage annuel dès le diagnostic est recommandé par le protocole national de diagnostic et de soins (PNDS) Mucoviscidose de 2017. La prise en charge des patients consiste, entre autres, en la vaccination contre l'hépatite A et B et un traitement par l'acide ursodésoxycholique. L'hypertension portale est surveillée et, le cas échéant, l'indication de transplantation hépatique est envisagée.

2. *Autres atteintes extra-pulmonaires*

L'espérance de vie des patients ayant considérablement augmenté ces dernières années, l'émergence de nouvelles atteintes est observée au cours de la vie des patients, notamment à l'âge adulte¹⁰⁹.

a) Atteinte génitale

La protéine CFTR est également localisée à la surface de l'épithélium du tractus génital. Les variants génétiques pathogènes de *CFTR* induisent un épaissement de la glaire cervicale chez la femme conduisant à une hypofertilité¹¹⁰. Néanmoins, les grossesses chez les femmes atteintes de mucoviscidose ne sont aujourd'hui plus des cas isolés. En effet, la moyenne des débuts de grossesses survenus en France chaque année entre 2006 et 2019 s'élève à 48,8 pour 1000 patientes (bilan des données 2019 du registre français de la mucoviscidose 2021).

Les hommes mucoviscidosiques sont, quant à eux, touchés par une infertilité due à une atrésie bilatérale des canaux déférents accompagnée d'une absence des vésicules séminales, ce qui entraîne une azoospermie dans 95 % des cas¹¹¹. En 2019, 28 hommes français atteints de mucoviscidose sont devenus pères, dont 3 paternités seulement étaient d'origine naturelle, les autres ayant été permises par l'aide médicale à la procréation (bilan des données 2019 du registre français de la mucoviscidose 2021).

b) Atteinte osseuse

La protéine CFTR semble également être exprimée au niveau osseux, dans les ostéoblastes et ostéoclastes^{112,113}.

Il y a une dizaine d'années, une déminéralisation osseuse avec ostéopénie et une ostéoporose étaient observées chez 85 % et 13 à 50 % des adultes atteints de mucoviscidose, respectivement¹¹⁴. En 2019, les chiffres concernant l'ostéopénie et l'ostéoporose confondues ne s'élèvent plus qu'à environ 15 % des adultes atteints de mucoviscidose (bilan des données 2019 du registre français de la mucoviscidose 2021).

Ces manifestations osseuses, dont la prévalence augmente avec l'âge des patients¹¹⁵, sont appelées *cystic fibrosis-related bone disease* (CFBD). Les mécanismes physiopathologiques sous-jacents semblent être multiples. D'une part la dysfonction de CFTR dans les cellules osseuses peut être directement responsable d'une dérégulation des mécanismes de synthèse et de dégradation osseuses¹¹⁶. D'autre part, les atteintes digestives responsables d'une malabsorption, entre autres, de vitamines D et K ainsi que la présence d'une inflammation chronique peuvent être à l'origine de fragilisations osseuses^{117,118}.

c) Atteinte rénale

L'atteinte rénale des patients atteints de mucoviscidose se traduit entre autres par une protéinurie, une hyponatrémie et une hypokaliémie¹¹⁹. Une insuffisance rénale apparaît chez 0,4 % des patients français en 2019. Les atteintes rénales sont un phénomène rare mais dont la fréquence augmente avec l'âge du patient : sur 32 patients souffrant d'insuffisance rénale terminale en 2019, 2 sont âgés de 20 à 24 ans, tandis que 13 sont âgés de plus de 40 ans (bilan des données 2019 du registre français de la mucoviscidose).

d) Atteinte des glandes sudoripares

L'atteinte des glandes sudoripares est historiquement celle qui permettait de pouvoir diagnostiquer la mucoviscidose, de par la perte de sel et la modification ionique de la sueur du patient. On parlait alors de « baiser salé » sur le front d'un enfant atteint de mucoviscidose. Les patients ont également de ce fait une sensibilité à la déshydratation accrue¹²⁰⁻¹²².

e) Atteinte ORL

La présence d'une inflammation chronique au niveau nasal favorise le développement de polypes, qui participent à la mise en place de sinusites chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose^{123,124}.

f) Douleurs

Les patients mucoviscidosiques souffrent de douleurs multiples et variées, transitoires ou chroniques. Elles peuvent être dues aux symptômes de la maladie, aux soins ou bien d'ordre psychologique. Il est important de les prendre en considération afin d'améliorer les conditions de vie des patients. Parmi les douleurs physiques associées aux symptômes de la mucoviscidose, il y a les douleurs abdominales ou dorsolombaires, les douleurs thoraciques, articulaires ou encore des maux de tête. Les soins tels que les prises de sang, les fibroscopies, les aspirations nasales ou la kinésithérapie thoracique peuvent également s'avérer douloureuses. L'explication du soignant sur le déroulement de la procédure et les moyens antalgiques utilisés jouent un rôle essentiel dans le rapport au soin du patient et donc dans la gestion de la douleur (<https://www.vaincrelamuco.org/vivre-avec/la-mucoviscidose/autres-symptomes/douleur>).

Les études portant sur les troubles psycho-sociaux rencontrés par les patients atteints de mucoviscidose se multiplient. Elles mettent en lumière des niveaux accrus d'anxiété ou de dépression chez les patients et les membres de leur famille comparés à la population générale ¹²⁵⁻¹²⁷.

g) Cancers

Avec l'augmentation de l'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose, d'autres pathologies apparaissent avec l'âge : c'est notamment le cas des cancers. En effet, *Neglia et al.* ont observé une augmentation de l'incidence des cancers du tractus digestif chez les patients constituant une cohorte suivie de manière rétrospective entre 1985 et 1992 ¹²⁸. Ces résultats ont été confirmés dans une cohorte étatsunienne suivie entre 1990 et 2009, dans laquelle *Maisonneuve et al.*, indiquent que les patients atteints de mucoviscidose sont également plus sujets à développer une leucémie lymphoïde ou un cancer du testicule ¹²⁹. Les risques de développer un cancer du pancréas, bien que très faibles, sont également augmentés dans la population mucoviscidosique comparée à la population générale ¹³⁰.

	0 – 10 ans	10 – 20 ans	20 – 35 ans	> 35 ans
Voies aériennes	Obstructions précoces et bronchectasie	Bronchectasie	Bronchectasie et hémoptysie	Insuffisance respiratoire et transplantation
Infection prédominante	<i>H. influenza</i> <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
Foie	Surélévation des enzymes hépatiques et hépatomégalie	CFLD	Hypertension portale	Transplantation
Intestin	Iléus méconial		Obstruction distale	
Pancréas	Insuffisance pancréatique exocrine		CFRD	
Système reproducteur	Absence de canaux déférents			
Os			CFBD	

Table 2. Les différentes atteintes organiques des patients mucoviscidosiques en fonction de leur âge.
Adapté de Elborn, 2016 ¹³¹.

b. Manifestations pulmonaires

1. Physiopathologie pulmonaire et caractéristiques cliniques de la mucoviscidose

L'atteinte respiratoire est la principale cause de mortalité et de morbidité des patients atteints de mucoviscidose ¹³². L'altération de la clairance mucociliaire et l'épaississement du mucus présent dans les voies respiratoires du patient induisent, d'une part, une obstruction bronchique réduisant le passage de l'air et, d'autre part, le développement de foyers infectieux par de multiples virus et autres micro-organismes pathogènes, tels que les champignons *Aspergillus fumigatus* ^{133,134} ou les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza* et *Pseudomonas aeruginosa* ¹³⁵. S'en suivent alors des cycles d'infection et d'inflammation responsables à terme de l'altération de l'intégrité des tissus pulmonaires et donc d'un déclin de la fonction respiratoire (**Figure 10**).

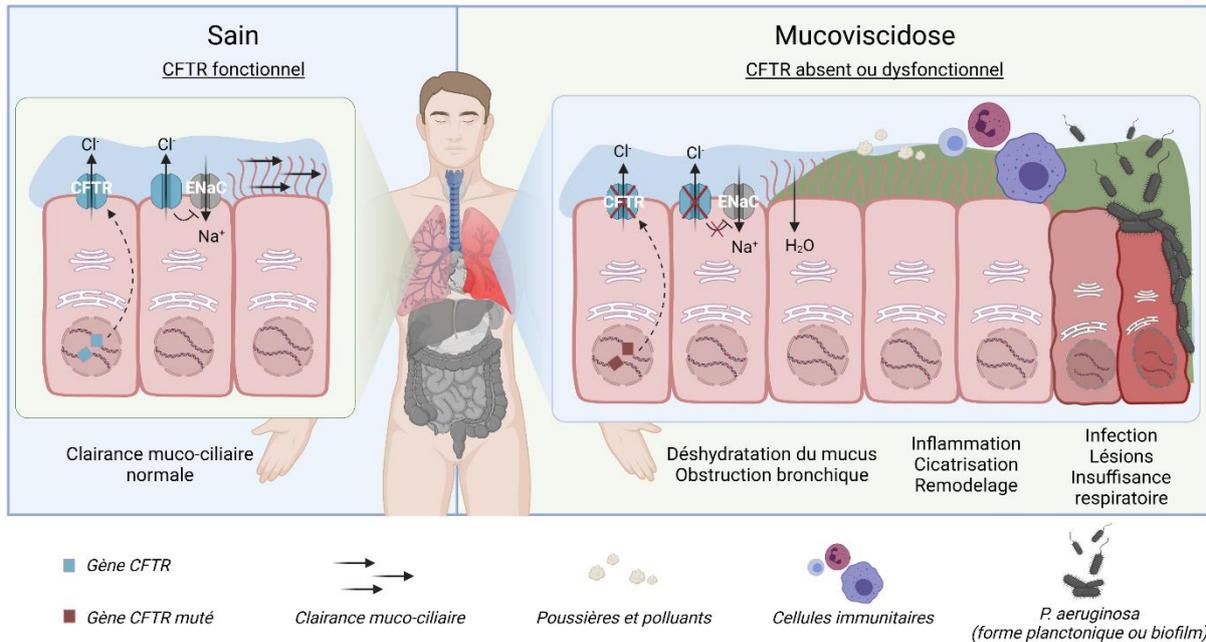


Figure 10. Physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose. Adapté de Amaral, 2015¹³⁶.

Les signes cliniques observables de la mucoviscidose sont une toux fréquente et chronique, avec expectoration de mucus, des infections respiratoires régulières et une respiration difficile. La bactérie *Staphylococcus aureus* est majoritairement retrouvée dans les voies respiratoires des patients au cours de la première moitié de leur vie, puis la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* devient majoritaire (bilan des données 2019 du registre français de la mucoviscidose 2021) (**Figure 11**).

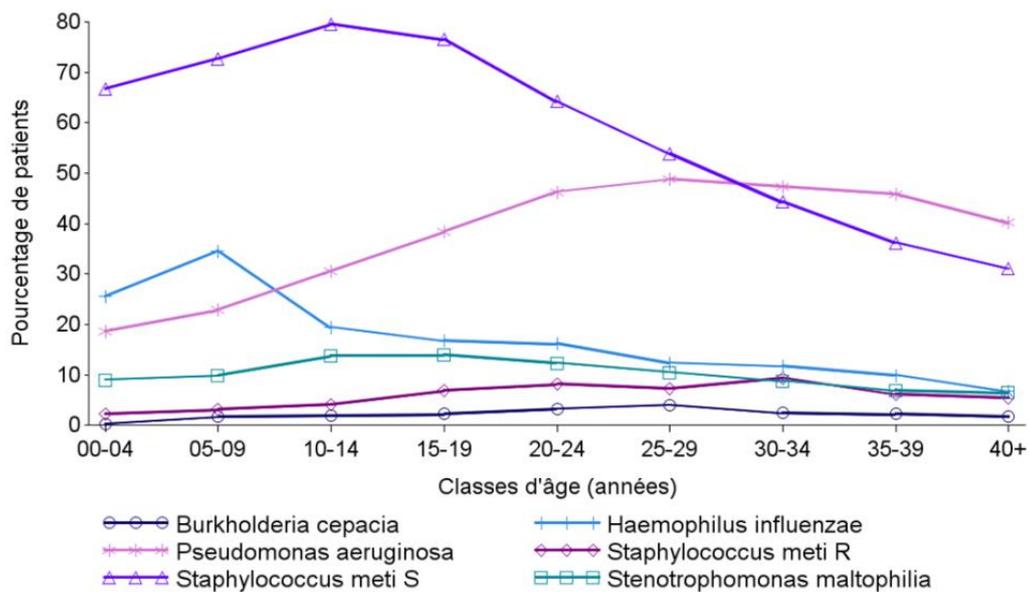


Figure 11. Evolution de la fréquence des différentes espèces bactériennes identifiées dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose au cours de leur vie. Extrait du bilan des données 2019 du registre français de la mucoviscidose 2021.

La fonction respiratoire est estimée cliniquement en mesurant par spirométrie le volume d'expiration maximal en une seconde (VEMS). De manière concrète, cette mesure est réalisée sur un patient au repos, nez bouché, qui réalise plusieurs cycles de respiration dans un embout relié à un spiromètre. Le patient inspire ensuite profondément avant de réaliser une expiration « forcée ». Le volume d'air expiré durant la première seconde de cette expiration est ensuite exprimé en pourcentage du volume d'air expiré attendu chez un individu sain du même âge et de même sexe. Cette mesure clinique est essentielle pour le suivi de la fonction pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose mais est également utilisée dans le cadre d'autres pathologies respiratoires telles que l'asthme ou la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Le déclin du VEMS est estimé comme étant légèrement inférieur à 2 % par an chez les patients atteints de mucoviscidose¹³⁷.

2. Les cycles d'infection-inflammation : « l'œuf ou la poule ? »

Une infection bactérienne très précoce chez les patients atteints de mucoviscidose entraîne une inflammation de leurs voies respiratoires et ce, dès le plus jeune âge¹³⁸⁻¹⁴⁰. Cette inflammation devient chronique, d'autant plus que différentes espèces bactériennes se succèdent ou co-existent, et colonisent les voies aériennes au cours de la vie des patients (bilan des données 2019 du registre français de la mucoviscidose 2021) (**Figure 11**). A l'âge adulte, la bactérie *P. aeruginosa* devient l'espèce dominante et majoritaire présente dans les voies respiratoires des patients. Son installation, d'abord intermittente puis chronique, est favorisée par son adaptation évolutive et le large éventail de facteurs de virulence dont elle dispose^{141,142}.

Ces multiples infections induisent donc des épisodes inflammatoires caractérisés par la présence au long cours de facteurs inflammatoires dans les voies respiratoires, produits et sécrétés par les cellules épithéliales des voies aériennes mais également par les cellules immunitaires des patients¹⁴³. De nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont ainsi retrouvées de façon accrue, précoce et persistante dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) des patients atteints de mucoviscidose^{138,139}. En effet, des concentrations élevées en interleukine-8 (IL-8)¹⁴⁴⁻¹⁴⁷, en interleukine-6 (IL-6)^{144,148,149}, en interleukine-1 β (IL-1 β)¹⁴⁸ et en *tumor necrosis factor α* (TNF α)¹⁴⁸ ont été retrouvées chez les patients^{140,150}. De récentes études ont montré que les proportions de certaines cytokines ainsi que les sous-types de cellules immunitaires impliqués semblent varier en fonction de l'âge des patients et/ou de l'avancée de la maladie^{140,151}. Ainsi, tandis que de fortes concentrations d'IL-6 sont retrouvées dans les LBA de très jeunes patients, elles sont au contraire plutôt faibles dans les LBA de patients présentant des stades avancés de mucoviscidose¹⁵¹. D'autres facteurs inflammatoires pouvant être impliqués dans la réponse à

l'infection par *P. aeruginosa* ont été mis en évidence, tels que les interleukines 4 (IL-4), 9 (IL-9), 10 (IL-10), 18 (IL-18), l'interféron γ (IFN γ), ainsi que des prostaglandines ou encore l'espèce réactive de l'oxygène monoxyde d'azote (NO)^{143,150,152,153}.

La mucoviscidose est caractérisée par une inflammation pulmonaire à dominance neutrophilique et dont les biomarqueurs sont l'IL-8, le nombre de neutrophiles ainsi que l'élastase qu'ils produisent (NE, pour *neutrophil elastase*), qui ont été montrés comme étant en corrélation directe avec la gravité de la maladie¹⁵⁴. L'IL-8 est une chimiokine chimiotactique permettant le recrutement des neutrophiles et est considérée comme ayant un rôle important dans la pathogenèse de la mucoviscidose¹⁵¹. Des concentrations accrues de NE sont alors retrouvées dans le liquide de surface, qui dépassent la capacité anti-élastasique des tissus de l'hôte : de fait, un déséquilibre protéases-antiprotéases est observé chez les patients atteints de mucoviscidose^{138,139,155-158}. D'autre part, d'autres protéases sont exprimées par *P. aeruginosa* ou par les neutrophiles, qui expriment par exemple la cathépsine G^{159,160}, accentuant encore plus le déséquilibre protéases-antiprotéases, et favorisant l'altération des tissus environnants. Les cellules lésées relarguent alors leur ADN, participant de ce fait à l'augmentation de la viscosité du mucus. Ce phénomène peut également être amplifié par le relargage de l'ADN neutrophilique lors de la NETose réalisée par les neutrophiles¹⁶¹ qui, après avoir joué leur rôle, ne rentrent pas en apoptose et ne sont pas phagocytés par les macrophages¹⁶². Ainsi, en plus de ne pas observer de résolution normale de l'inflammation, les neutrophiles entrent en nécrose et relarguent leur contenu au sein des voies respiratoires, provoquant davantage de lésions : ADN, actine fibrillaire, protéases et oxydants¹⁶³. Le traitement par la rhDNase, permettant de dégrader les molécules d'ADN présentes dans le mucus, fait notamment partie des pistes thérapeutiques permettant de réduire la viscosité de ce dernier^{161,164,165}. Par ailleurs, la production de médiateurs des neutrophiles et d'exoproduits bactériens, connus pour induire la production de mucines - principales composantes macromoléculaires du mucus - seraient en partie responsables de l'hypersécrétion de mucus observée dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose¹⁶⁶. De plus, l'hyperviscosité du mucus présent dans les voies aériennes des patients semble favoriser le développement de biofilms bactériens¹⁶⁷ et empêcher la phagocytose des bactéries¹⁶⁸.

Ce contexte inflammatoire est ainsi favorisé et aggravé par la présence de *P. aeruginosa*, bactérie qui dispose de nombreux facteurs de virulence et qui sera décrite plus en détails dans la partie suivante.

Cependant, un concept ayant provoqué de vifs débats au sein de la communauté scientifique au début des années 2000 est apparu, selon lequel l'inflammation présente chez les patients atteints de mucoviscidose précéderait toute infection¹⁶⁹. En effet, de manière intéressante, la présence notable de marqueurs inflammatoires dans des LBA de très jeunes patients mucoviscidosiques a été observée^{138,139} et ce même en l'absence, *a priori*, d'infection préalable^{145,169-171}.

Néanmoins, ces résultats font toujours débat au sein de la communauté scientifique¹⁷². Entre autres hypothèses, la possibilité d'infections bactériennes, ou même virales, non détectables avec les moyens de l'époque, n'est pas excluable et ne permettrait donc pas d'affirmer que l'inflammation précéderait l'infection.

Ainsi, la chronologie exacte des cycles infection-inflammation ainsi que leur origine endogène ou exogène reste encore à élucider.

3. *Pseudomonas aeruginosa*

a) Généralités

La bactérie *P. aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif, ubiquitaire et opportuniste¹⁷³. En effet, étant saprophyte – c'est-à-dire capable de se nourrir de matière organique morte ou en décomposition – elle est retrouvée dans la plupart des plans d'eau stagnante, sols humides ou à la surface des végétaux. Bien qu'elle ne représente pas de réel danger pour un individu sain, elle peut néanmoins devenir très pathogène pour un individu ayant ses défenses immunitaires diminuées ou « surmenées ». Comme la plupart des microorganismes dits opportunistes, *P. aeruginosa* peut être à l'origine d'infections nosocomiales. En effet, une étude prospective réalisée entre 2013 et 2019 dans 268 hôpitaux répartis dans 42 pays d'Afrique, d'Amérique du Nord et du Sud, d'Europe, d'Asie du Sud-Est et des régions Pacifique-Ouest a montré l'implication de *P. aeruginosa* dans 6 % des infections recensées par cathéter veineux¹⁷⁴.

La présence d'un flagelle rend cette bactérie, en forme de bâtonnet, motile. Au cours de la colonisation de l'hôte, *P. aeruginosa* adopte un mode de vie sessile en perdant son flagelle et en formant un biofilm (**Figure 12**), la rendant difficilement accessible aux antibiotiques et favorisant ainsi sa survie¹⁷⁵.

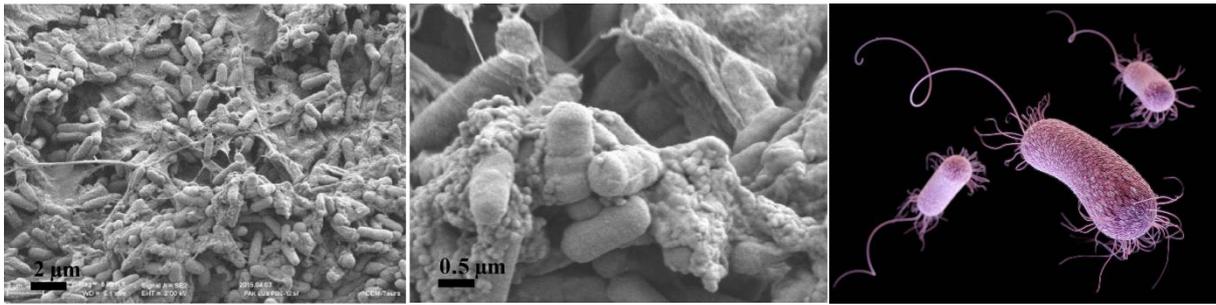


Figure 12. Microphotographies de la bactérie *P. aeruginosa*. A gauche et au centre, microphotographies obtenues par microscopie électronique à balayage (Guillon *et al.*, 2018¹⁷⁶) du biofilm d'une souche de *P. aeruginosa*. A droite, une représentation tridimensionnelle de la forme planctonique de *P. aeruginosa* générée par ordinateur à partir d'images de microscopie à balayage (Crédit : Jennifer Oosthuizen - *Medical Illustrator - CDC/ Antibiotic Resistance Coordination and Strategy Unit*).

P. aeruginosa a été isolée dans les années 1890 à partir de blessures de deux patients en France. Elle doit un de ses noms à la couleur bleu-vert caractéristique du pus associé aux infections qu'elle provoquait : *Bacillus pyocyaneus* (« bacille du pus bleu »)¹⁷⁷.

La pathogénicité d'un microorganisme peut s'expliquer par l'expression de facteurs de virulence. Ces derniers peuvent être définis comme des produits issus du génome de l'agent infectieux qui a tiré un avantage évolutif lui permettant d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte et de profiter de ses ressources¹⁷⁸. Un facteur de virulence peut donc par exemple favoriser l'adhérence du pathogène aux cellules hôtes, ainsi que l'échappement ou l'inhibition du système immunitaire de l'hôte. On parle alors respectivement de colonisation, d'immunoévasion ou d'immunosuppression. D'autre part, les facteurs de virulence peuvent également être exprimés sous forme de toxines qui endommagent directement les cellules environnantes.

P. aeruginosa, pathogène majoritaire dans les voies respiratoires des patients mucoviscidosiques adultes (**Figure 11**), exprime de nombreux facteurs de virulence - membranaires ou sécrétés - et a développé au cours de son évolution une résistance aux antibiotiques¹⁷⁹.

Ainsi, l'apparition d'une colonisation chronique par *P. aeruginosa*, de par ses nombreux facteurs de virulence et sa résistance aux antibiotiques, est peu encourageante vis-à-vis du pronostic du patient^{179,180}. C'est pourquoi nous nous intéressons particulièrement à cette bactérie et à certains de ses facteurs de virulence au cours de cette étude.

b) Le « quorum sensing » (QS) de *P. aeruginosa*

L'expression de nombreux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* est régulée par un mécanisme dépendant de la densité bactérienne appelé quorum sensing (QS)¹⁸¹. Il s'agit d'un système de communication bactérienne reposant sur la synthèse et la diffusion d'acylhomosérine lactone (AHL) de proche en proche, d'une bactérie à une autre. Ce mécanisme a été décrit en détails par Ruimy *et al.*¹⁸².

Le QS est retrouvé dans plusieurs espèces de bactéries à Gram négatif¹⁸³, dont certaines sont à l'origine d'infections opportunistes chez l'homme telles que *P. aeruginosa*¹⁸⁴⁻¹⁸⁷. Le QS permet, dans cette bactérie, une induction de la transcription des gènes dits de virulence¹⁸⁸.

Deux systèmes ont été découverts chez *P. aeruginosa* : le système *las*, qui a été le premier décrit¹⁸⁵ et le système *rhl*. Le système *las* comprend les gènes *lasR* et *lasI*, codant respectivement pour une protéine régulatrice LasR et une enzyme auto-inducteur synthase, LasI¹⁸². Cette dernière est nécessaire pour la production de l'AHL N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C12-HSL), qui possède la faculté de traverser les membranes bactériennes, constituant ainsi un moyen de communication inter-bactérien¹⁸². Lorsque les niveaux de 3-oxo-C12-HSL atteignent un certain seuil, proportionnellement à la densité bactérienne, une molécule d'AHL se fixe à deux protéines LasR afin de former un complexe activateur de transcription. Plusieurs gènes vont ainsi être transcriptionnellement induits, de manière synchrone dans la totalité de la population bactérienne. Parmi les gènes régulés par le système *las*, sont induits *lasB*¹⁸⁵, *lasA*¹⁸⁹ et *aprA*¹⁸⁴, qui codent respectivement pour des élastases et une protéase alcaline, responsables en partie de la destruction des tissus pulmonaires ; ou encore *lasI*, qui permet une rapide augmentation de la synthèse de 3-oxo-C12-HSL, amplifiant ainsi le signal au sein de la population bactérienne par auto-induction¹⁹⁰. Selon le même principe, le système *rhl* comprend le gène *rhlR* et le gène *rhlI*, codant respectivement pour la protéine régulatrice RhlR et une enzyme auto-inducteur synthase RhlI¹⁸². Cette dernière est nécessaire à production d'un autre AHL : le N-butyryl-L-homosérine lactone (C4-HSL)^{191,192}. Le complexe RhlR-C4-HSL contrôle, entre autres, l'expression des gènes *lasB*, *lasA*, *aprA* et *rhlI*¹⁸². Les différents acteurs du QS de *P. aeruginosa* et leurs interactions sont représentés schématiquement pour une meilleure compréhension dans la **Figure 13**.

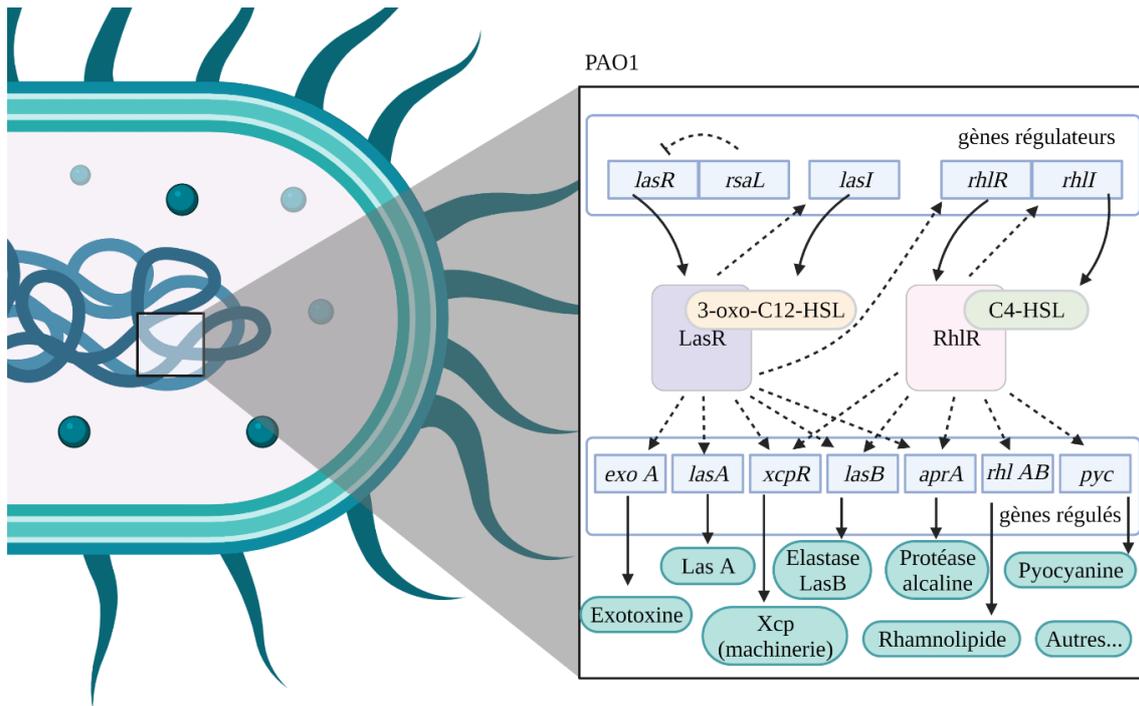


Figure 13. Représentation de divers acteurs du « quorum sensing » (QS) de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*. Adapté de Ruimy *et al.*, 2004 ¹⁸².

c) Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

Parmi les différents facteurs de virulence exprimés par *P. aeruginosa* (**Figure 14**), nous nous intéresserons plus particulièrement au lipopolysaccharide (LPS), à la flagelline (FLA) ainsi qu'à LasB, l'élastase codée par le gène *lasB*.

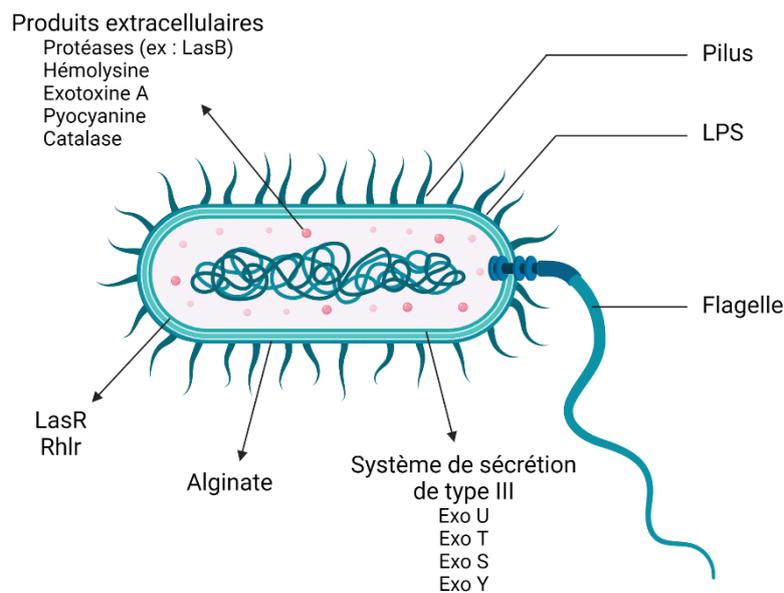


Figure 14. *P. aeruginosa* et ses principaux facteurs de virulence. Adapté de Sadikot *et al.*, 2005 ¹⁴³.

i. L'élastase LasB

L'élastase LasB de *P. aeruginosa*, aussi appelée pseudolysine, est une métalloprotéase dont la taille de 33kDa et la présence d'un site actif et de trois sites de liaison d'atome de zinc ont été caractérisés dès 1988¹⁹³. Les données bioinformatiques actuelles suggèrent la fixation d'un ion Zn^{2+} et d'un ion Ca^{2+} en tant que cofacteurs de cette protéase (Source : Uniprot, <https://www.uniprot.org/uniprot/P14756>).

LasB a une activité catalytique lui permettant de dégrader diverses protéines telles que le collagène de type I¹⁹⁴ ou des composants de la matrice extracellulaire (collagène de types III et IV, élastine, fibronectine, laminine, vitroneurine), pouvant provoquer des lésions tissulaires et des hémorragies¹⁹⁵. La capacité de cette élastase à cliver la partie N-terminale du récepteur *proteinase-activated receptor 2* (PAR-2) dans les voies respiratoires, inhibant sa fonction, a également été mise en évidence¹⁹⁶. L'activation du récepteur PAR-2 a souvent été décrite comme déclenchant une cascade pro-inflammatoire¹⁹⁷. Néanmoins, ce constat semble plus nuancé au sein du tissu pulmonaire, dans lequel l'activation de PAR-2 pourrait avoir des effets pro-inflammatoires ou au contraire protecteurs¹⁵⁹. En effet, des études ont montré que l'activation de ce récepteur induit, d'une part, la production de prostaglandine E₂ (PGE₂), ayant un rôle broncho-protecteur et anti-inflammatoire au niveau pulmonaire^{198,199} et, d'autre part, la production de facteurs pro-inflammatoires tels que la métalloprotéinase matricielle-9 (MMP9)²⁰⁰, le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF)^{201,202}, l'éotaxine²⁰², l'IL-6 et l'IL-8²⁰³. Ainsi, PAR-2, exprimé par divers types cellulaires des voies respiratoires et notamment au niveau apical des cellules épithéliales, est un important facteur de la réponse immunitaire innée pulmonaire. Sa neutralisation fonctionnelle par clivage par l'élastase LasB de *P. aeruginosa* favoriserait ainsi la colonisation bactérienne, tout en altérant les processus de défense et de réparation tissulaire¹⁵⁹.

LasB, en plus de sa capacité à endommager les tissus, semble également altérer directement les composants du système immunitaire^{204,205}. Elle est capable de cliver les immunoglobulines A et G^{206,207}. Par ailleurs, des expériences impliquant une infection de l'hémolymph de la larve du ver à soie par les souches PAO1 de *P. aeruginosa* sauvages ou délétées pour LasB (PAO1 Δ LasB) ont indiqué que la présence de LasB induit une diminution de la production de peptides antimicrobiens synthétisés naturellement par les insectes²⁰⁸. Cette fonction immunomodulatrice de LasB avait également été montrée par sa capacité à dégrader la flagelline de *P. aeruginosa*, permettant à la bactérie de ne pas être reconnue et d'échapper au

système immunitaire ²⁰⁹. D'autre part, LasB semble agir au niveau intracellulaire en initiant la croissance du biofilm formé par *P. aeruginosa* ^{210,211}.

Une étude récente a également montré l'implication de LasB dans la dégradation de médiateurs immunitaires tels que l'IL-6 ou la trappine-2, un médiateur anti-inflammatoire ²¹² ; tandis qu'elle induit la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales pulmonaires ²¹³.

Pour finir, LasB joue un rôle primordial dans le contexte de la mucoviscidose car elle altère les processus de réparation épithéliale en inhibant la voie de signalisation IL-6/STAT3 et semble provoquer une diminution de l'expression et de la fonction du canal CFTR ²¹². Ces données font suite à une précédente étude montrant qu'une autre élastase produite par des neutrophiles humains (hNE), est également capable de dégrader CFTR et de diminuer sa fonction *in vitro* et *in vivo* ²¹⁴.

Les nombreux substrats de LasB connus à l'heure actuelle sont répertoriés dans une revue parue en septembre 2021²⁰⁷, néanmoins, la démonstration d'un clivage effectif *in vivo* reste à faire pour une majorité d'entre eux.

Ainsi, d'après Cathcart *et al.*²¹⁵, l'élastase LasB de *P. aeruginosa* pourrait jouer son rôle de facteur de virulence de trois façons :

- en dégradant directement les tissus de l'hôte par une protéolyse permettant la libération de nutriments favorables à la croissance bactérienne
- en agissant sur l'immunomodulation et les composants du système immunitaire de l'hôte, favorisant l'apparition de cycles inflammatoires
- en favorisant la formation de biofilms bactériens, augmentant ainsi la résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques et à la réponse immunitaire de l'hôte.

S'ajoute à ces trois éléments l'action de LasB sur l'expression et la fonction de CFTR, indiquant un lien avec la protéine dont les variants pathogènes sont responsables de la mucoviscidose et faisant donc de LasB une potentielle cible thérapeutique ²⁰⁷.

ii. Le lipopolysaccharide (LPS)

Le lipopolysaccharide (LPS) est un *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP), facteur clé de la virulence de certains agents bactériens et des réponses immunitaires de l'hôte. Il s'agit d'un élément constitutif de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, composé de 3 parties :

- le lipide A : partie hydrophobe du LPS qui permet son ancrage à la membrane externe de la bactérie. Elle possède plusieurs isoformes pouvant être penta-, hexa- ou hepta-acylées, chacune ayant une affinité différente avec le récepteur *Toll-like receptor 4* (TLR4). Ce dernier est impliqué dans l'activation de l'immunité innée via la reconnaissance des pathogènes^{216,217}. Un mécanisme évolutif de *P. aeruginosa* a permis d'observer l'apparition d'une palmitoylation du lipide A dans des souches cliniques isolées de patients atteints de mucoviscidose²¹⁸. Cette modification du lipide A pourrait permettre à la bactérie de masquer ce composant du LPS et donc d'échapper à une éventuelle réponse immunitaire ;
- le noyau oligosaccharidique ou core : est lui-même composé d'un noyau interne et d'un noyau externe, variables selon les espèces bactériennes. Chez *P. aeruginosa*, le core est composé de Kdo, d'heptose, de galactosamine, de glucose et de rhamnose²¹⁷. Il s'agit ainsi d'une région polaire, assurant une stabilité de la membrane *via* des interactions avec des cations divalents²¹⁹, et des protéines spécifiques²²⁰ ;
- l'antigène O : polymère composé d'unités de sucres répétitives variables en fonction des espèces²²¹. L'antigène O peut être ajouté à la molécule de LPS ou non, ainsi seulement certaines molécules de LPS ont une « coiffe » d'antigène O. La longueur de l'antigène O semble être associée à une résistance aux défenses immunitaires de l'hôte, notamment *via* une interférence avec les voies d'activation du complément²¹⁷. De plus, l'antigène O protégerait également les bactéries de la phagocytose²²².

iii. La flagelline

La flagelline est une protéine monomérique très conservée au sein des différentes espèces bactériennes et qui, présente en plus d'un millier d'exemplaires, constitue le flagelle de *P. aeruginosa*²²³. Elle est ainsi impliquée dans la motilité de la bactérie puis dans son passage d'état planctonique à l'état de biofilm. En effet, le flagelle disparaît lors de la formation du biofilm bactérien, retrouvé fréquemment chez les patients mucoviscidosiques colonisés de manière chronique par *P. aeruginosa*²²⁴.

La flagelline bactérienne se fixe aux récepteurs *Toll-like receptor 5* (TLR5) et induit la production par les cellules de cytokines pro-inflammatoires, en réponse à l'infection^{225,226}. D'après nos connaissances actuelles, cette production de cytokines se fait *via* deux voies de signalisation (**Figure 15**) : la voie p38 MAPK²²⁷⁻²²⁹ et la voie NF-κB²³⁰.

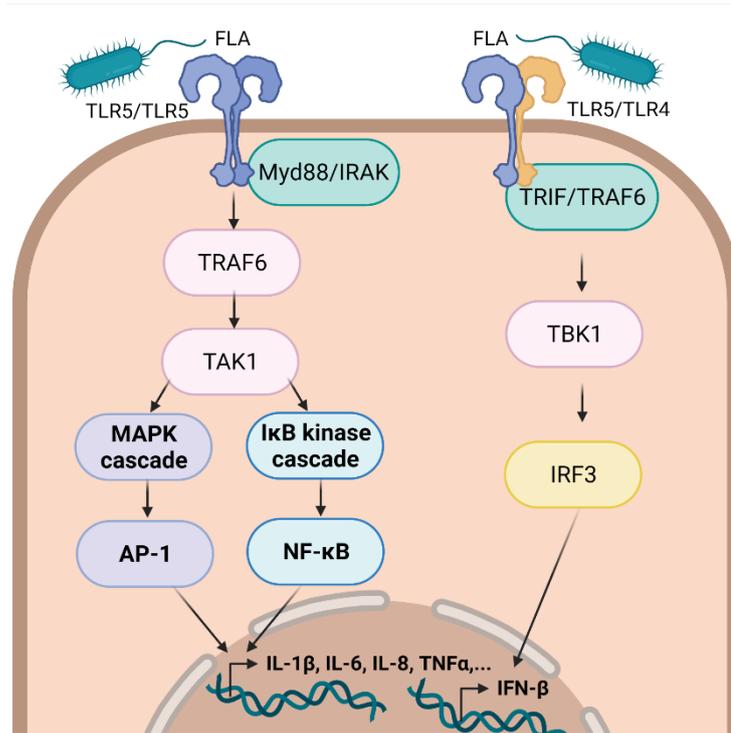


Figure 15. Voies de signalisation activées par la flagelline de *P. aeruginosa*.
Adapté de Hajam *et al.*, 2017²³¹

Les cellules de mammifères ont acquis au cours de l'évolution l'expression du récepteur TLR5, qui reconnaît les monomères de flagelline et induit l'activation de la réponse immunitaire innée, permettant de lutter contre les pathogènes flagellés²³². Parmi les stratégies d'immunoévasion mises en place par les bactéries, *P. aeruginosa* sécrète une protéase alcaline AprA qui inhibe la signalisation TLR5 en dégradant les monomères de flagelline présents dans l'environnement, laissant le polymère de flagelline qui constitue le flagelle et le récepteur TLR5 intacts²³³. Plus récemment, il a été montré que l'élastase LasB agit de concert avec AprA²⁰⁹ (**Figure 16**).

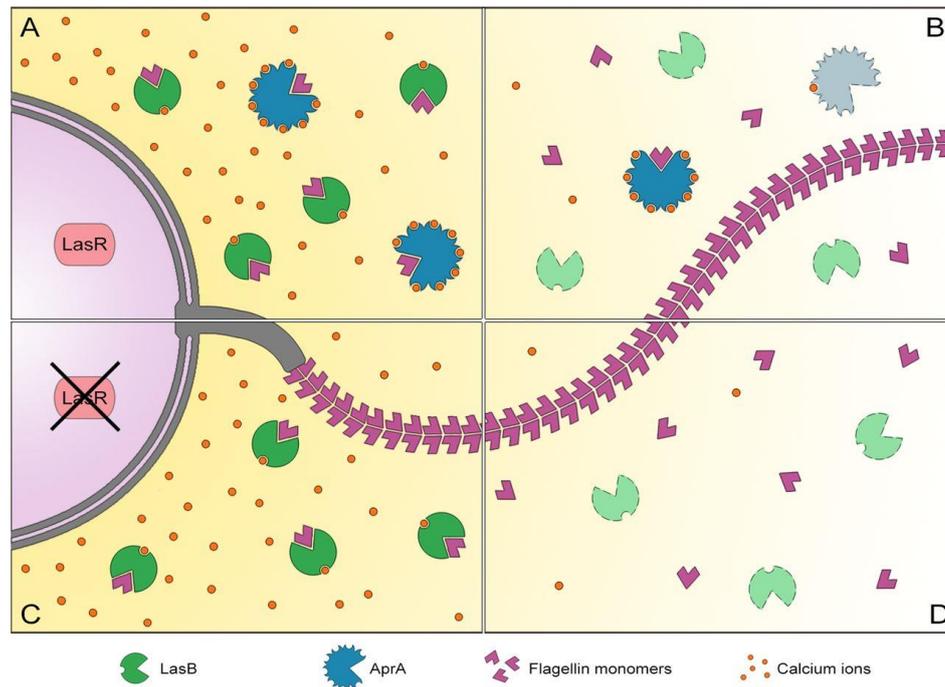


Figure 16. Représentation de l'impact des protéinases LasB et AprA sur la reconnaissance immunitaire induite par la flagelline de *P. aeruginosa*. **(A)** Dans des conditions de croissance optimales, LasB et AprA sont produites et peuvent agir pour éliminer la flagelline. **(B)** La faible disponibilité des ions calcium entraîne la perte de l'activité de LasB; l'activité d'AprA est moins sensible à la pénurie de calcium et agit comme un agent anti-flagelline. **(C)** La perte de LasR abolit la production d'AprA. En présence de quantités suffisantes de calcium, l'activité LasB élimine la flagelline. **(D)** La perte de LasR entraîne la perte d'AprA et la faible disponibilité des ions calcium rend LasB non fonctionnelle. L'inactivation des deux protéases conduit à une immunogénicité accrue en raison de la reconnaissance immunitaire médiée par la flagelline. Extrait de Casilag *et al.*, 2015¹⁷⁸

d) *P. aeruginosa* et réparation épithéliale

Des études ont montré que la protéine CFTR joue un rôle fondamental dans divers événements cellulaires tels que le développement foetal^{234–239}, la différenciation et la polarisation du tissu épithélial^{240–244}, la transition épithélio-mésenchymateuse^{245–249} ainsi que les processus de régénération tissulaire^{250–252}.

Ainsi, les patients atteints de mucoviscidose présentent une altération de la réparation épithéliale. Cette dernière est essentielle à la restauration de l'intégrité de l'épithélium bronchique et de sa fonction de barrière en cas d'infection, d'inflammation ou encore de lésion²⁵³. Plusieurs étapes constituent le processus de réparation : l'adhésion et la migration cellulaires, pendant lesquelles les cellules recouvrent le site de la blessure, puis la prolifération des cellules qui finissent par se redifférencier, afin de reconstituer un épithélium polarisé intact^{254–256}.

Les processus de réparation ont été observés lors d'une xénogreffe de voies respiratoires humaines dans un modèle murin, permettant de comparer la régénération tissulaire des épithéliums normaux et mucoviscidosiques ²⁵¹. Les résultats indiquent un retard de différenciation du tissu CF, associé à une prolifération accrue au cours de la réparation et ce, même en l'absence d'inflammation ^{250,251}. Ce retard de réparation et cette augmentation de prolifération cellulaire ont été confirmés dans diverses études revues par Amaral *et al.*, en 2020 ²⁵³. D'autre part, la régénération altérée dans les cellules des voies respiratoires CF semble être partiellement améliorée par l'utilisation de modulateurs de CFTR, suggérant que la fonction de ce canal est essentielle à la réparation épithéliale des voies respiratoires ²⁵⁷. De manière intéressante, des expériences de réparation réalisées sur des cellules épithéliales primaires des voies aériennes humaines normales ou mucoviscidosiques différenciées, en présence ou non du facteur de virulence flagelline (FLA) de *P. aeruginosa*, ont mis en évidence des différences de niveaux ainsi que de temporalité d'expression des marqueurs génétiques des différents types cellulaires ²⁵⁸. Ces résultats nous apportent davantage de compréhension sur les mécanismes sous-jacents à la différenciation et la régénération des cellules épithéliales des voies aériennes humaines, encore mal connus à ce jour ²⁵⁸.

Ainsi, en plus de la fonction de CFTR, la présence de facteurs de virulence de *P. aeruginosa* tels que la flagelline semble également impacter la réparation épithéliale.

L'influence de *P. aeruginosa* sur l'intégrité et la réparation épithéliales a été revue en détails par Ruffin *et al.*, ²⁵⁹. Brièvement, les divers facteurs de virulence de *P. aeruginosa* permettent de créer des lésions au niveau de l'épithélium des voies aériennes, tels que les rhamnolipides, qui contribuent à la rupture de la barrière épithéliale par le biais d'altérations de jonctions serrées ²⁶⁰. D'autre part, et comme précisé précédemment, LasB, joue également un rôle majeur dans l'intégrité épithéliale en altérant la matrice extracellulaire de l'épithélium bronchique *via* la dégradation des protéines de collagène de type I et de type IV ^{194,261}. La perte de fibres de stress et la dépolymérisation du cytosquelette d'actine ont par ailleurs été observées après l'exposition de cellules épithéliales des voies aériennes à LasB purifiée ²⁶². Enfin, une étude réalisée chez la souris a mis en évidence des lésions tissulaires étendues et un remodelage suite à une exposition pulmonaire chronique à la pyocyanine, caractérisés par une hyperplasie des cellules caliciformes, une fibrose et une destruction alvéolaire ²⁶³. Ces différentes lésions favorisent l'adhésion de la bactérie, qui se lie préférentiellement au bord des plaies épithéliales ainsi qu'au niveau des membranes basales dorénavant accessibles ²⁶⁴⁻²⁶⁶. Aussi, il a été montré que *P. aeruginosa* adhère plus fréquemment au mucus et aux cellules mortes ^{265,266} ainsi qu'aux

cellules basales et cellules migratoires aplaties présentant des lamellipodes^{264,267,268}. Enfin, des études ont montré que les facteurs sécrétés par *P. aeruginosa* ont tendance à diminuer la prolifération des cellules épithéliales des voies respiratoires^{269,270} et la migration cellulaire^{262,270} (**Figure 17**).

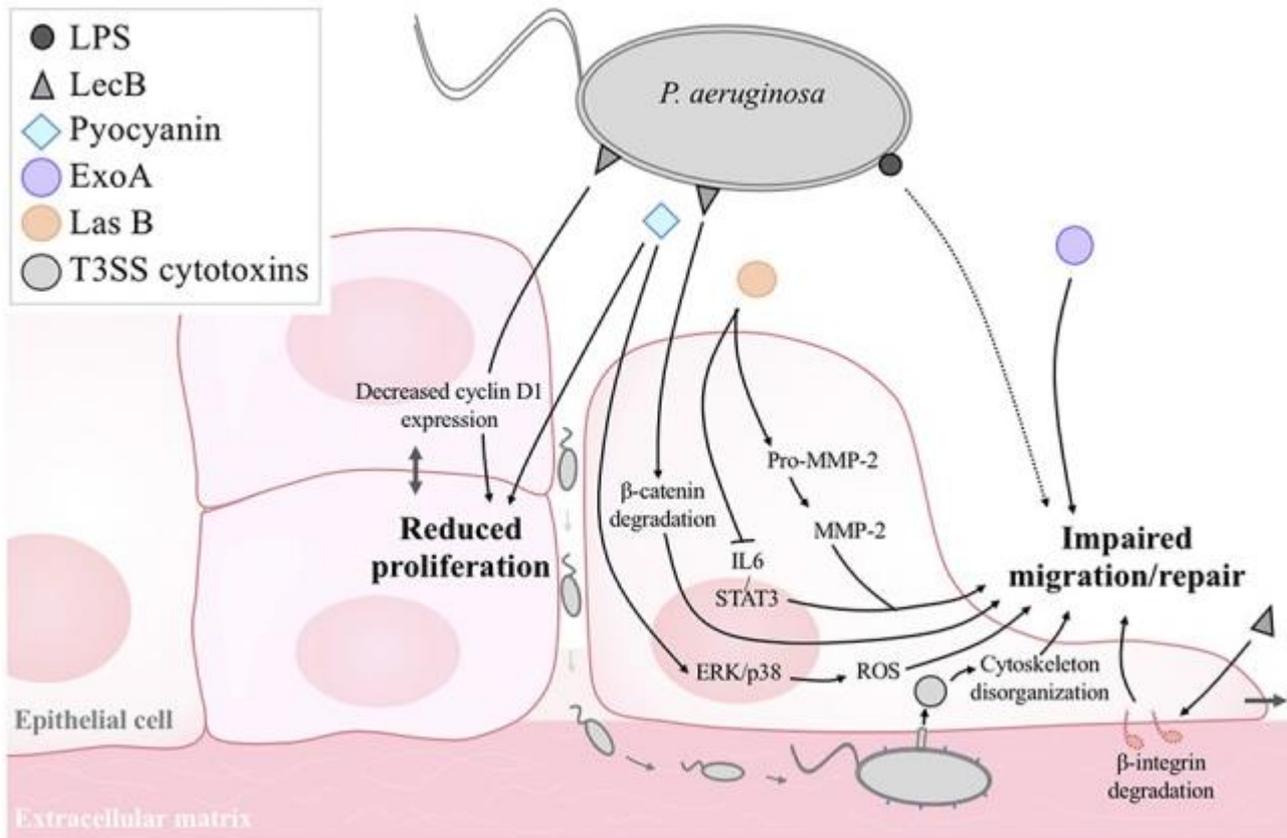


Figure 17. Impact de *P. aeruginosa* sur la prolifération, la migration et la réparation épithéliale bronchique. Extrait de Ruffin *et al.*, 2019²⁵⁹.

Ainsi, la physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose est très complexe et majoritairement responsable de la mortalité des patients atteints de mucoviscidose. C'est pourquoi il existe à ce jour plusieurs pistes thérapeutiques visant à traiter l'atteinte respiratoire des patients. Chaque stratégie thérapeutique agit à des niveaux différents de la cascade physiopathologique de la mucoviscidose.

4. Soins et traitements de l'atteinte pulmonaire

A ce jour, il n'existe pas de traitement permettant la guérison de la mucoviscidose. La prise en charge de l'atteinte respiratoire des patients (**Figure 18**) consistait jusqu'à présent majoritairement en des traitements symptomatiques, tels que la kinésithérapie et l'administration de mucolytiques. Ces traitements permettent une fluidification et une évacuation du mucus, favorisant le dégagement des voies respiratoires, améliorant la respiration

et limitant les infections. Des séances de nébulisations permettent une administration rapide et locale de différents médicaments, tels que des antibiotiques ou des anti-inflammatoires. (<https://www.vaincrelamuco.org/vivre-avec/la-mucoviscidose/symptomes-respiratoires/aerosols>). La voie intraveineuse est privilégiée dans certains cas, notamment lors d'épisodes d'exacerbations respiratoires nécessitant une cure d'antibiotiques. Ces traitements sont contraignants, demandent beaucoup de temps et peuvent être douloureux pour les patients.

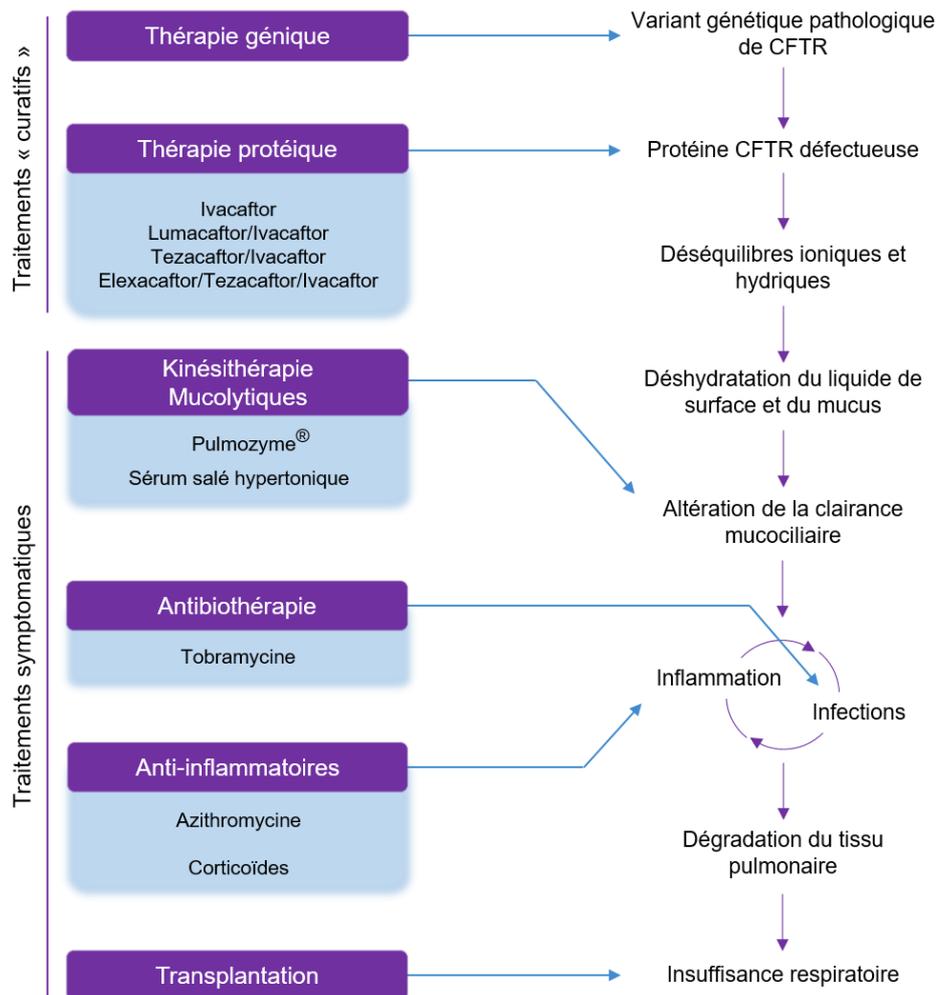


Figure 18. Stratégies thérapeutiques de prise en charge de l'atteinte respiratoire des patients atteints de mucoviscidose.

Bien qu'ayant prouvé leur efficacité, ces traitements permettent une prise en charge des conséquences de la maladie, et non de la cause, comme ont pour but les thérapies protéiques et géniques. Les avantages et limites de ces thérapies dites curatives, qui ont connu des avancées majeures ces dernières années, ont été développées en détail dans notre récente revue perspective²⁷¹. Lorsque la dégradation du tissu pulmonaire est trop importante et que l'état du

patient atteint l'insuffisance respiratoire, le seul traitement possible est alors la transplantation pulmonaire^{272,273}.

a) Thérapie protéique

La thérapie protéique est la stratégie thérapeutique à visée curative et la plus développée à ce jour. Elle a pour but de rétablir le transport à la membrane de la protéine CFTR correctement formée et/ou de permettre son fonctionnement optimal. Le type de modification pharmacologique à apporter dépend donc principalement de la classe de variants mise en cause.

Ainsi, la société Vertex Pharmaceuticals a mis au point des « correcteurs » de CFTR tel que le Lumacaftor® (ou Vx-809), qui permet d'empêcher la dégradation de la protéine et rend possible sa maturation puis son trafic depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à la membrane plasmique. L'efficacité de cette molécule a été démontrée notamment en observant une augmentation des efflux chlorures dépendants de CFTR et une augmentation de l'épaisseur du liquide de surface²⁷⁴. Ce médicament vise principalement les variants de classe II telles que F508del.

D'autres molécules appelées « potentiateurs » de CFTR permettent quant à elles de favoriser la fonction de la protéine, en augmentant par exemple la conductance ou la probabilité d'ouverture du canal. Le Kalydéco® (ou Ivacaftor ou Vx-770) est le premier potentiateur de CFTR à avoir été testé lors d'essais cliniques²⁷⁵ et obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) par la commission européenne. Cette molécule cible les variants de classe III et IV.

L'association du Lumacaftor® et du Kalydéco® a donné naissance à Orkambi®. Ce médicament a montré au cours de différentes études cliniques une augmentation de 5 % du VEMS de patients homozygotes F508del, ainsi qu'une diminution du nombre d'hospitalisations et d'exacerbations respiratoires de ces patients²⁷⁶⁻²⁷⁸. Orkambi® obtient à la suite de ces études une AMM de la *Food and drug administration* (FDA) en 2015 ainsi que de l'Agence européenne du médicament (AEM) en 2016.

Un nouveau correcteur de CFTR, Tezacaftor® ou Vx-661, est utilisé en association avec l'Ivacaftor® sous le nom de Symdeko® depuis 2018. En octobre 2019, une nouvelle association de Symdeko® avec l'Eleacaftor (Vx-445), un correcteur de CFTR de nouvelle génération, a montré des effets prometteurs lors d'un essai clinique de phase 3²⁷⁹.

Au cours de la dernière décennie, de nouveaux médicaments appelés "modulateurs de CFTR" s'attaquant aux conséquences directes des variants de *CFTR* sur la protéine CFTR ont été

identifiés grâce au criblage à haut débit ²⁸⁰. Les variants de *CFTR* de classe I, qui entraînent l'absence de synthèse protéique, et les variants de *CFTR* de classe V et VI, qui entraînent une diminution de la production de la quantité de protéines CFTR, sont exclus des thérapies par modulateur.

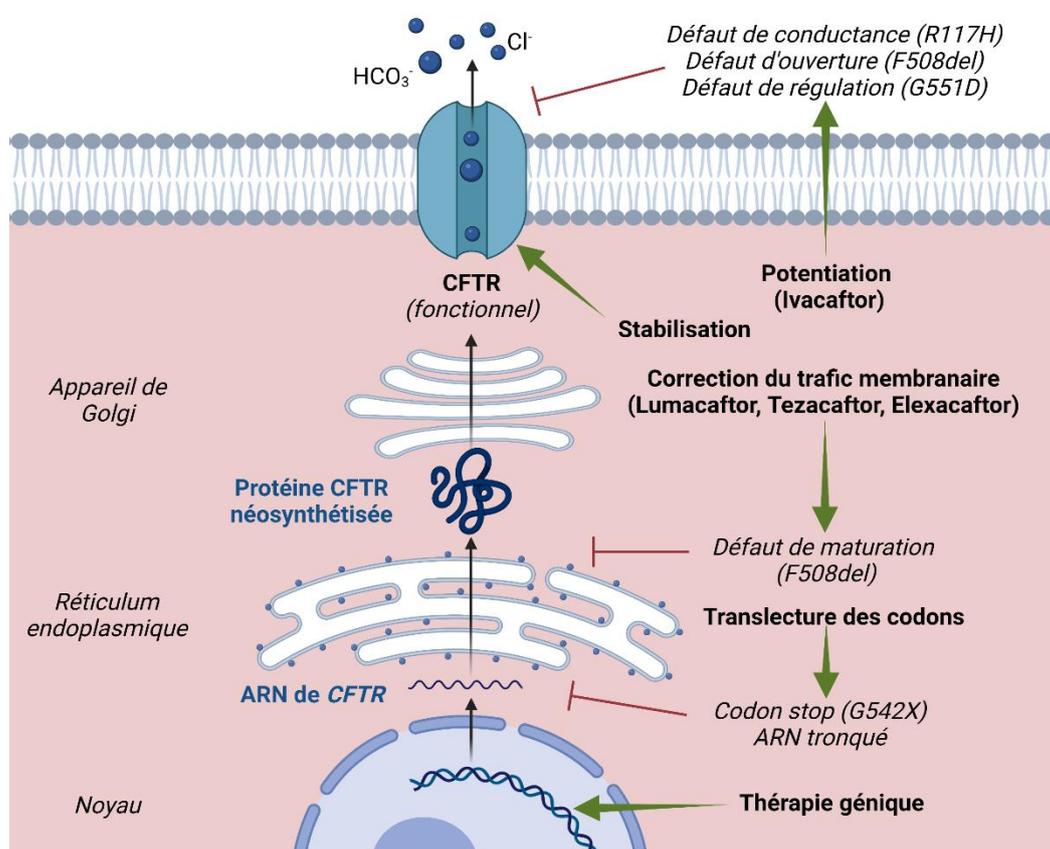


Figure 19. Cibles et modes d'action des différentes thérapies en fonction du variant de *CFTR*. Adapté de <https://lejournal.cnrs.fr/articles/de-nouvelles-strategies-contre-la-mucoviscidose>, F. Aguila, S. Belaud, 2017.

L'approbation des modulateurs de CFTR représente une percée dans le traitement de la mucoviscidose car une amélioration significative de la fonction pulmonaire des patients (évaluée par des mesures du VEMS) a été observée (**Table 3**).

Molécules	First approval date	Eligibility age	Indication*	Absolute change in ppFEV1
Ivacaftor	2012	≥6 m.o.	G551D/other Ramsey et al. (2011) Class III variants/Other Davies et al. (2013)	10.6% 12.5%
Lumacaftor/ivacaftor	2015	≥2 y.o.	F508del/F508del Wainwright et al. (2015)	2.8%
Tezacaftor/ivacaftor	2018	≥6 y.o.	F508del/F508del Taylor-Cousar et al. (2017) F508del/residual function variant in trans Rowe et al. (2017)	4% 6.8%
Elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor	2019	≥12 y.o.	F508del/minimal function variant in trans Middleton et al. (2019) F508del/F508del Heijerman et al. (2019)	13.8% 10.4%

Table 3. Les modulateurs de CFTR actuellement sur le marché. Extrait de Mercier *et al.*, 2021²⁷¹. (ppFEV1 : percent-predicted forced expiratory volume in 1 sec ; m.o. : months old ; y.o. : years old)

Ivacaftor, le premier potentialisateur conçu pour cibler le variant G551D (le variant de classe III le plus répandu), a montré lors de l'essai clinique de phase 3 que les patients gagnent plus de 10 % de VEMS²⁸¹. L'ivacaftor a ensuite été validé pour d'autres variants de *CFTR* de classe III. Quelques années plus tard, des modulateurs ciblant le variant le plus fréquent de *CFTR*, F508del, sont apparus. L'association du correcteur lumacaftor et du potentiateur ivacaftor a été approuvée pour les patients F508del homozygotes mais a montré une amélioration limitée du VEMS. De nouveaux correcteurs et de nouvelles combinaisons ont été développés par la suite, ayant des effets plus importants sur le gain de VEMS et permettant de traiter les patients porteurs d'un seul variant F508del (**Table 3**). La dernière combinaison (elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor) a en effet montré des résultats impressionnants avec une augmentation de 14 % du VEMS^{279,282}. Même si le niveau d'augmentation de la fonction pulmonaire reste la principale mesure de l'efficacité du traitement, ces modulateurs se sont également révélés bénéfiques pour d'autres paramètres cliniques, notamment l'augmentation de l'indice de masse corporelle, l'amélioration de la qualité de vie et la diminution de la fréquence des exacerbations²⁸³.

Au total, en fonction de leur âge et de leur génotype, environ 80 % des patients recensés dans le registre des patients de la *Cystic Fibrosis Foundation* sont éligibles aux modulateurs de *CFTR* (<https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/>). Selon ce registre, 10 % des patients sont encore trop jeunes pour être éligibles aux modulateurs de *CFTR* ; et les 10 % restants sont soit porteurs de variants de *CFTR* dont la réponse aux modulateurs est encore inconnue, soit ayant un génotype inconnu ou incomplet. Parmi ces patients, on a estimé que 7 % pourraient avoir besoin de thérapie génique.

Dans cette nouvelle ère prometteuse, d'autres préoccupations subsistent. Par exemple, il est important de noter que le recul concernant ces nouveaux traitements est limité, ce qui rend difficile l'évaluation de leur efficacité et de leur tolérance à long terme. Selon les politiques nationales de santé, le coût de ces traitements pourrait également constituer un obstacle à leur accès pour tous les patients atteints de mucoviscidose. Enfin, comme le montre une récente étude rétrospective, parmi 845 patients ayant commencé le traitement lumacaftor/ivacaftor, 22,8 % l'ont totalement ou temporairement interrompu, principalement en raison d'effets indésirables respiratoires²⁸⁴. Ces effets indésirables pourraient donc limiter le nombre total de patients pouvant bénéficier de ces traitements.

La dernière génération de modulateurs, la trithérapie, elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor, a donné des résultats impressionnants, ce qui nous amène à nous interroger sur la pertinence de la poursuite des recherches sur la thérapie génique dans la mucoviscidose.

b) Thérapie génique

La thérapie génique consiste à introduire un gène fonctionnel dans les cellules hôtes pour remplacer un gène défectueux. En théorie, cela pourrait parfaitement répondre aux besoins d'une maladie monogénique comme la mucoviscidose et pourrait conduire à un traitement universel pour les patients atteints de mucoviscidose. Johnson et ses collègues ont pu montrer en 1992 que 6 à 10 % des cellules corrigées pour CFTR sont suffisantes pour observer un effet fonctionnel *in vitro*²⁸⁵. Nous pouvons ainsi imaginer que la correction de toutes les cellules bronchiques d'un patient mucoviscidosique n'est peut-être pas nécessaire afin d'observer le même effet *in vivo*.

Cependant, la course au traitement de la mucoviscidose par la thérapie génique s'est avérée plus difficile que prévu jusqu'à présent.

Le poumon représente un organe de choix pour l'administration de traitements spécifiques aux organes en raison de sa facilité d'accès. Par conséquent, l'administration par aérosol a été largement utilisée dans les précédents essais cliniques de thérapie génique pulmonaire, comme l'ont examiné Resnier *et al.*²⁸⁶. Cependant, la difficulté majeure rencontrée lors de ces essais est la délivrance du gène dans les cellules épithéliales des voies respiratoires. En effet, le mucus, la clairance mucociliaire et les réponses immunitaires pulmonaires compliquent l'entrée de l'agent de transfert de gènes dans les cellules cibles, et les rares qui y parviennent rencontrent un nouvel obstacle : la membrane nucléaire²⁸⁷⁻²⁹⁰. De plus, comme l'épithélium des voies respiratoires se renouvelle progressivement, un autre défi est de cibler les cellules progénitrices pour obtenir un traitement permanent et éviter les interventions répétées nécessaires²⁹¹.

Un an seulement après la découverte du rôle du gène *CFTR* dans la mucoviscidose en 1989⁸⁶⁻⁸⁸, deux groupes ont montré de manière indépendante qu'il était possible de produire une protéine CFTR fonctionnelle en utilisant un vecteur viral pour introduire le gène complet *in vitro*^{292,293}. Cette preuve de concept a ouvert la voie aux premiers essais cliniques de thérapie génique de la mucoviscidose. Pour introduire efficacement un gène *CFTR* normal dans les cellules, diverses stratégies d'administration ont été mises au point au cours des trois dernières

décennies, y compris des systèmes de vecteurs viraux et non viraux, récemment revus en détail ^{271,294–296}.

À ce jour, les essais cliniques de la thérapie génique de la mucoviscidose n'ont pas été concluants. En effet, les résultats de ces essais ont souvent permis d'observer un faible impact sur la fonction pulmonaire des patients et ce, associé à d'importantes réponses immunitaires pouvant rendre le traitement inefficace. En outre, comme mentionné précédemment, le récent développement de médicaments efficaces tels que la trithérapie, a donné naissance à l'idée que "la mucoviscidose est presque guérie". Cependant, les médicaments actuellement sur le marché ne s'adressent pas à tous les patients, laissant près de 10 % des patients atteints de mucoviscidose sans traitement curatif, comme le souligne le registre des patients de la CFF.

Au cours des 20 dernières années, la thérapie génique a donné de bons résultats, transitoires ou permanents, pour plusieurs maladies, telles que le déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X ²⁹⁷, le déficit en adénosine désaminase ²⁹⁸, l'amaurose congénitale de Leber ²⁹⁹, l'hémophilie ³⁰⁰, la bêta-thalassémie sévère ^{301,302}, mais aussi la maladie de Parkinson ³⁰³ ou la leucémie, dont 27 enfants sont en rémission complète après traitement ³⁰⁴. En 2012, le premier traitement par thérapie génique virale a été approuvé en Europe pour le traitement du déficit en lipoprotéine lipase ³⁰⁵ et a donné de bons résultats même des années plus tard ³⁰⁶. Récemment, la thérapie génique a également montré des résultats prometteurs dans le cadre du traitement de la neuropathie optique héréditaire de Leber en améliorant la vision bilatérale des patients sur 96 semaines de suivi après une injection intravitréenne unilatérale ³⁰⁷. Ces essais fructueux ont été réalisés sur des cellules souches hématopoïétiques facilement accessibles ou par des injections de vecteurs directement au sein de tissus spécifiques. Ces modes d'administration ne sont actuellement pas applicables dans le cadre de la mucoviscidose, ce qui peut expliquer l'échec des précédents essais de thérapie génique par rapport à d'autres maladies.

En plus de la stratégie d'administration du gène *CFTR* de type sauvage, l'édition du gène *CFTR* par la technologie CRISPR/Cas9 est apparue comme une option thérapeutique prometteuse pour les patients atteints de mucoviscidose ³⁰⁸. De nouvelles stratégies sont également testées dans le cadre d'essais en cours, tels que l'essai clinique de phase I/II RESTORE-CF (<http://ClinicalTrials.gov> Identifiant: NCT03375047), qui évalue la sécurité et la tolérance de MRT5005, une thérapie à base d'ARN. La thérapie à base d'ARN présente l'avantage de ne pas perturber le génome, mais elle nécessite des administrations répétées²⁷¹.

Une autre stratégie prometteuse consiste à combiner la thérapie génique avec des cellules souches pluripotentes (iPSC) : on parle alors de thérapie cellulaire. À titre de preuve de concept, Hawkins *et al.* ont récemment réussi à dériver des cellules basales des voies respiratoires à partir de iPSC humaines, à effectuer une xénogreffe trachéale chez des souris immunodéprimées, et à générer un épithélium ayant une structure et une composition similaires à celles des voies respiratoires *in vivo*³⁰⁹. L'objectif à long terme est d'obtenir une génération *de novo* de toute la diversité des cellules pulmonaires et de créer des tissus pulmonaires transplantables, qui pourraient être corrigés par thérapie génique et transplantés directement dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose³¹⁰.

La piste de la thérapie génique comme traitement universel de la mucoviscidose semble encore avoir un bel avenir devant elle.

Toutefois, bien que la mucoviscidose soit une maladie monogénique, les variants génétiques de *CFTR* n'expliquent pas à eux seuls les différentes sévérités des manifestations de la maladie chez les patients mucoviscidosiques.

Chapitre 3 – Solute Carrier Family 6 Member 14 (SLC6A14), un gène modificateur de la mucoviscidose

I- Mucoviscidose et gènes modificateurs

Une diversité considérable des manifestations cliniques est observée chez les patients porteurs de mêmes variants génétiques de *CFTR*³¹⁰⁻³¹². En effet, des études réalisées chez des vrais et faux jumeaux CF ont montré une atteinte pulmonaire différente chez les faux-jumeaux malgré un environnement et des variants de *CFTR* identiques. Les vrais jumeaux, quant à eux, ne semblaient pas présenter de différence phénotypique. Ces résultats suggèrent ainsi l'implication d'un facteur génétique situé en dehors du locus de *CFTR*³¹⁰. Ce type de facteur génétique responsable d'une variabilité inter-individuelle est appelé « gène modificateur ». Dans le cadre de la mucoviscidose, les gènes modificateurs expliqueraient près de 50 % de la variabilité des phénotypes pulmonaires tels que l'obstruction des voies aériennes, ou l'infection par *P. aeruginosa*³¹⁰ (**Figure 20**).

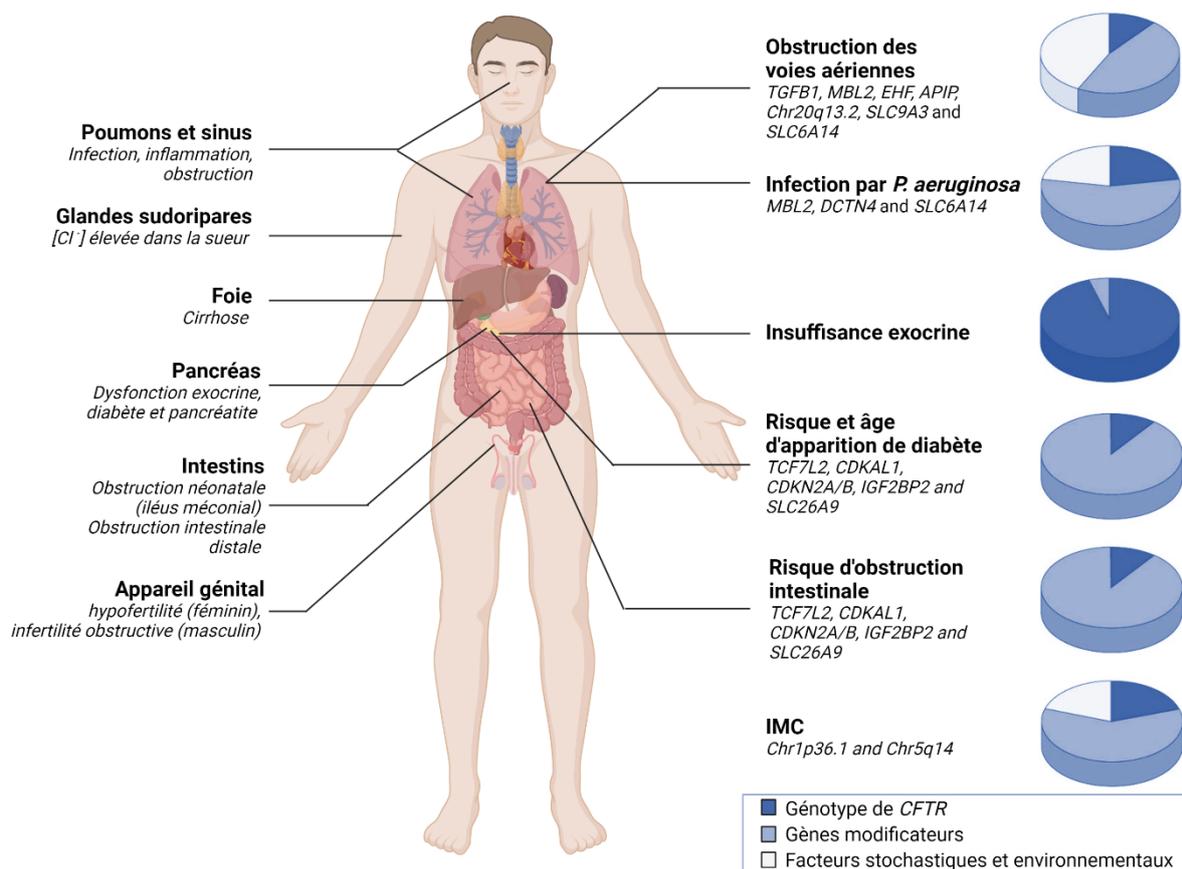


Figure 20. Contribution relative des gènes modificateurs à la variabilité des phénotypes de la mucoviscidose. Adapté de Cutting, 2015³¹⁰.

Les signes cliniques de la mucoviscidose sont représentés à gauche sur la **Figure 20**. La sévérité des différentes atteintes varie considérablement d'un patient à l'autre. Comme décrit par Cutting³¹⁰, les gènes modificateurs et les facteurs non génétiques contribuent tous deux à

l'obstruction des voies respiratoires et à l'infection par *P. aeruginosa*, deux caractéristiques qui définissent la maladie pulmonaire dans la mucoviscidose. Le génotype de *CFTR* est le principal déterminant de l'insuffisance exocrine pancréatique, qui, lorsqu'elle est sévère, est une condition préalable au développement du diabète et de l'obstruction intestinale. Dans le cadre d'un dysfonctionnement endocrinien sévère, les gènes modificateurs déterminent si et quand le diabète ou l'obstruction intestinale néonatale se produisent. La variation génétique joue un rôle prédominant dans l'état nutritionnel, évalué par l'indice de masse corporelle (IMC) ³¹³.

Plusieurs gènes modificateurs de la mucoviscidose ont été identifiés ces dernières années notamment grâce à la création d'un consortium international entre l'Amérique du Nord et la France dans l'objectif de réaliser une étude d'association génétique à grande échelle appelée GWAS pour *genome wide association study*. Cette technique permet le séquençage de très nombreux polymorphismes ou SNP (*single nucleotide polymorphism*). Ainsi, 6 365 patients atteints de mucoviscidose avaient été inclus dans un GWAS réalisé en 2015 ³¹⁴ (**Figure 21**), permettant d'identifier 5 loci de gènes modificateurs de l'atteinte respiratoire de la mucoviscidose.

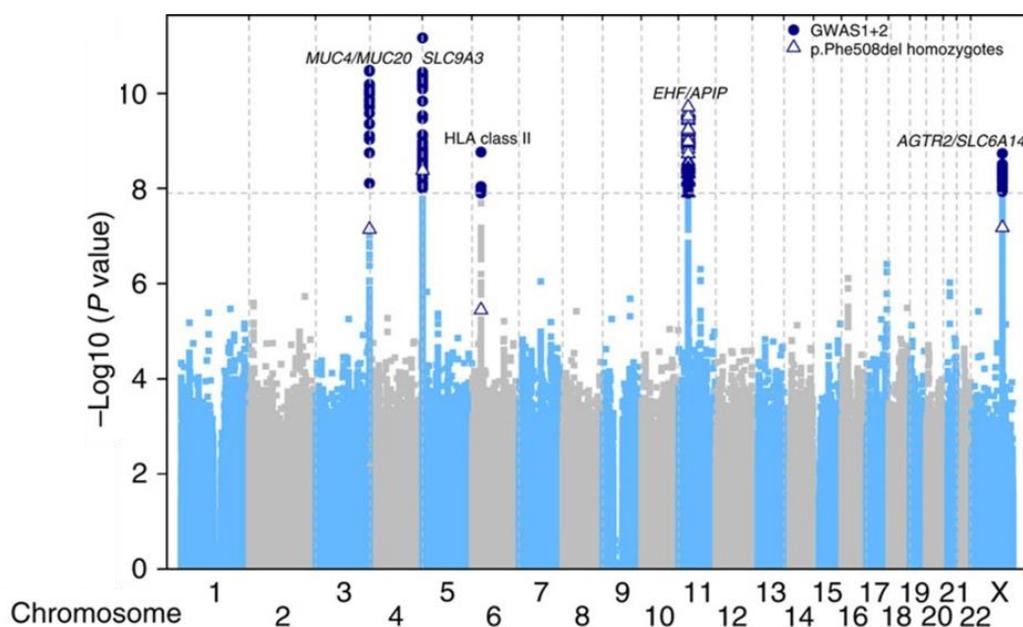


Figure 21. Association génotype-phénotype respiratoire dans la mucoviscidose. *Manhattan plot* issu d'une méta-analyse de GWAS réalisée par Corvol *et al.*, 2015 ³¹⁴. Les cercles fermés représentent les données obtenues sur la totalité de la cohorte de patients tandis que les triangles représentent les homozygotes F508del. La ligne de pointillés indique le seuil de significativité ($p < 1.25 \times 10^{-8}$). Cinq loci ont ainsi été identifiés, dont celui de *SLC6A14*.

De nombreux gènes modificateurs de la mucoviscidose ont par ailleurs été identifiés tels que *TAS2R38*, impliqué dans l'atteinte naso-sinusienne et les infections des voies respiratoires supérieures ³¹⁵, mais aussi *TGF- β 1* ^{316,317}, *BPIFA1* ³¹⁸, *TNF α* et *TNFR2* ³¹⁹ ou encore

*SERPINA1*³²⁰. L'existence d'autres gènes modificateurs impliqués dans la sévérité des phénotypes respiratoire et hépatique, mais aussi dans la susceptibilité d'apparition d'un IM, d'un diabète ou encore dans la réponse au traitement Ivacaftor a été décrite par Paranjapye *et al.*³²¹ (**Figure 22**).

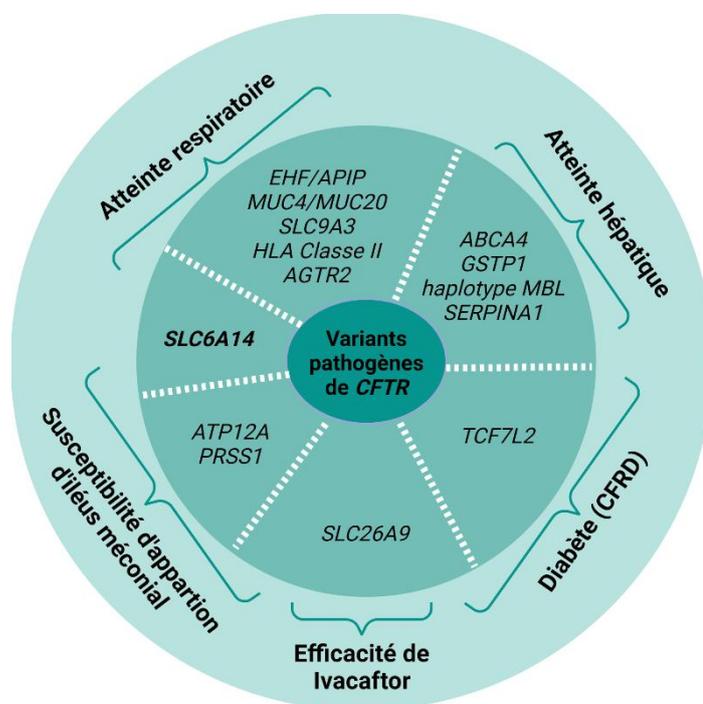


Figure 22. Représentation schématique de gènes modificateurs et de leur implication dans la variabilité des atteintes de la mucoviscidose et/ou dans l'efficacité des traitements. Adapté de Paranjapye *et al.*, 2020³²¹. *Ets homologous factor (EHF)*, *Apaf-1 interacting protein (APIP)*, *mucin 4 (MUC4)*, *mucin 20 (MUC20)*, *solute carrier family 9 member A3 (SLC9A3)*, *class II major histocompatibility complex (HLA Class II)*, *angiotensin II receptor type 2 (AGTR2)*, *solute carrier family 6 member 14 (SLC6A14)*, *nongastric form of the H⁺/K⁺- ATPase (ATP12A)*, *serine protease 1 (PRSS1)*, *solute carrier family 26 member 9 (SLC26A9)*, *transcription factor 7-like 2 (TCF7L2)*, *ATP binding cassette subfamily A member 4 (ABCA4)*, *glutathione S transférase (GSTP1)*, et un haplotype *mannose-binding lectin (MBL)*, *serpin family A member 1 (SERPINA1)*.

II- Le gène *SLC6A14* et sa protéine

Parmi les différents gènes modificateurs de la mucoviscidose identifiés, nous nous sommes intéressés au gène *solute carrier family 6 member 14 (SLC6A14)* aussi appelé *ATB*^{0,+}, qui semble avoir des effets pléiotropes chez les patients atteints de mucoviscidose^{314,322–327}. Certains variants de ce gène ont notamment été associés à l'apparition d'un IM à la naissance³²⁷, à une primo-infection des voies aériennes par *P. aeruginosa* plus précoce³²³ ainsi qu'à une diminution de la fonction respiratoire³¹⁴.

a. Expression du gène *SLC6A14* et de sa protéine en conditions physiologiques

1. Généralités

Le gène *SLC6A14* est situé sur le chromosome X et a été cloné en 1999 à partir d'une bibliothèque d'ADNc de glandes mammaires ³²⁸. Ce gène produit deux transcrits (ENST00000598581.3 et ENST00000463626.1) mais un seul code pour une protéine (ENSG00000087916.7) qui comprend 642 acides aminés avec un poids moléculaire attendu de 72 kDa. Ce gène contient la séquence codante d'un transporteur d'acides aminés localisé à la membrane plasmique.

La protéine SLC6A14 fait partie de la grande famille des *solute carriers* (SLC) - et plus particulièrement au groupe des SLC6 qui contient 21 protéines humaines classifiées en fonction de la similitude de leurs séquences d'acides aminés ³²⁹. SLC6A14 utilise l'énergie fournie par le gradient électrochimique des ions Na⁺ et Cl⁻ pour importer et concentrer la quasi-totalité des acides aminés neutres et basiques au sein du cytoplasme de divers types cellulaires. Seuls la proline, l'acide glutamique et l'acide aspartique ne sont pas transportés par ce *solute carrier*³²⁸.

Bien qu'aucune étude structurale n'ait encore été menée spécifiquement sur SLC6A14, des études structurales et cristallographiques réalisées sur d'autres membres de la famille SLC6, ainsi qu'une analyse des domaines topologiques de SLC6A14 (<https://uniprot.org/uniprot/Q9UN76>), suggèrent que les domaines aminoterminal et carboxyterminal de la protéine sont cytoplasmiques et que la séquence comprend 12 domaines transmembranaires putatifs et 1 grand domaine extracellulaire entre les domaines transmembranaires 3 et 4 ³²⁹ (**Figure 23**).

La protéine SLC6A14 est exprimée de façon ubiquitaire, majoritairement au niveau des glandes salivaires, des poumons et du tractus génital (**Figure 24**). L'ARNm de *SLC6A14* est quant à lui principalement exprimé dans les poumons, la trachée et les glandes salivaires ³²⁸.

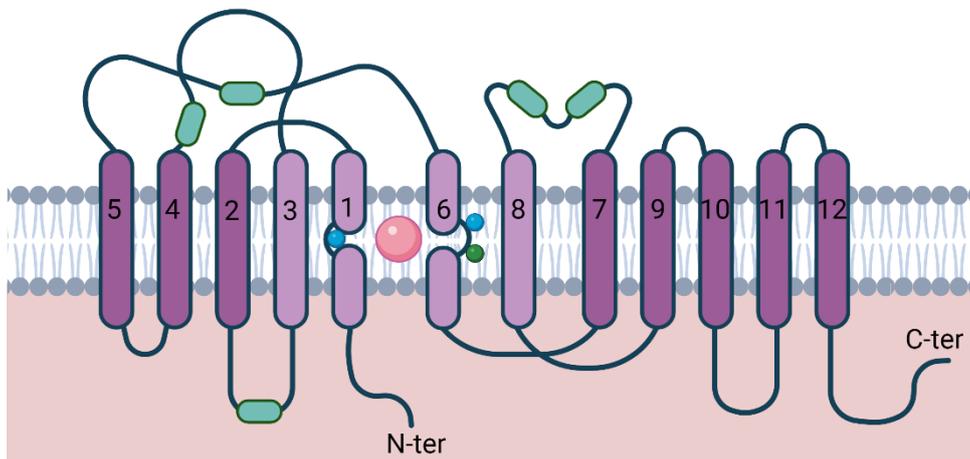
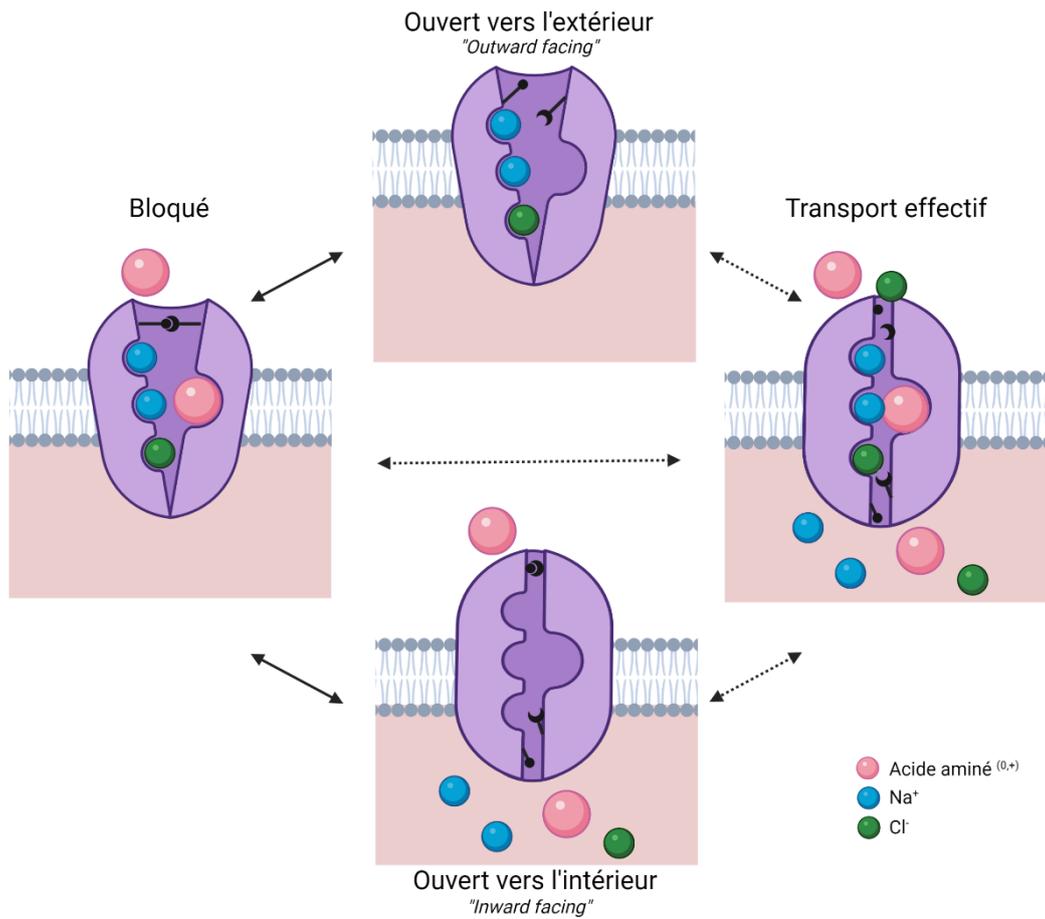


Figure 23. Configurations présumées de la protéine SLC6A14. Adaptée de Pramod *et al.*, 2013³²⁹

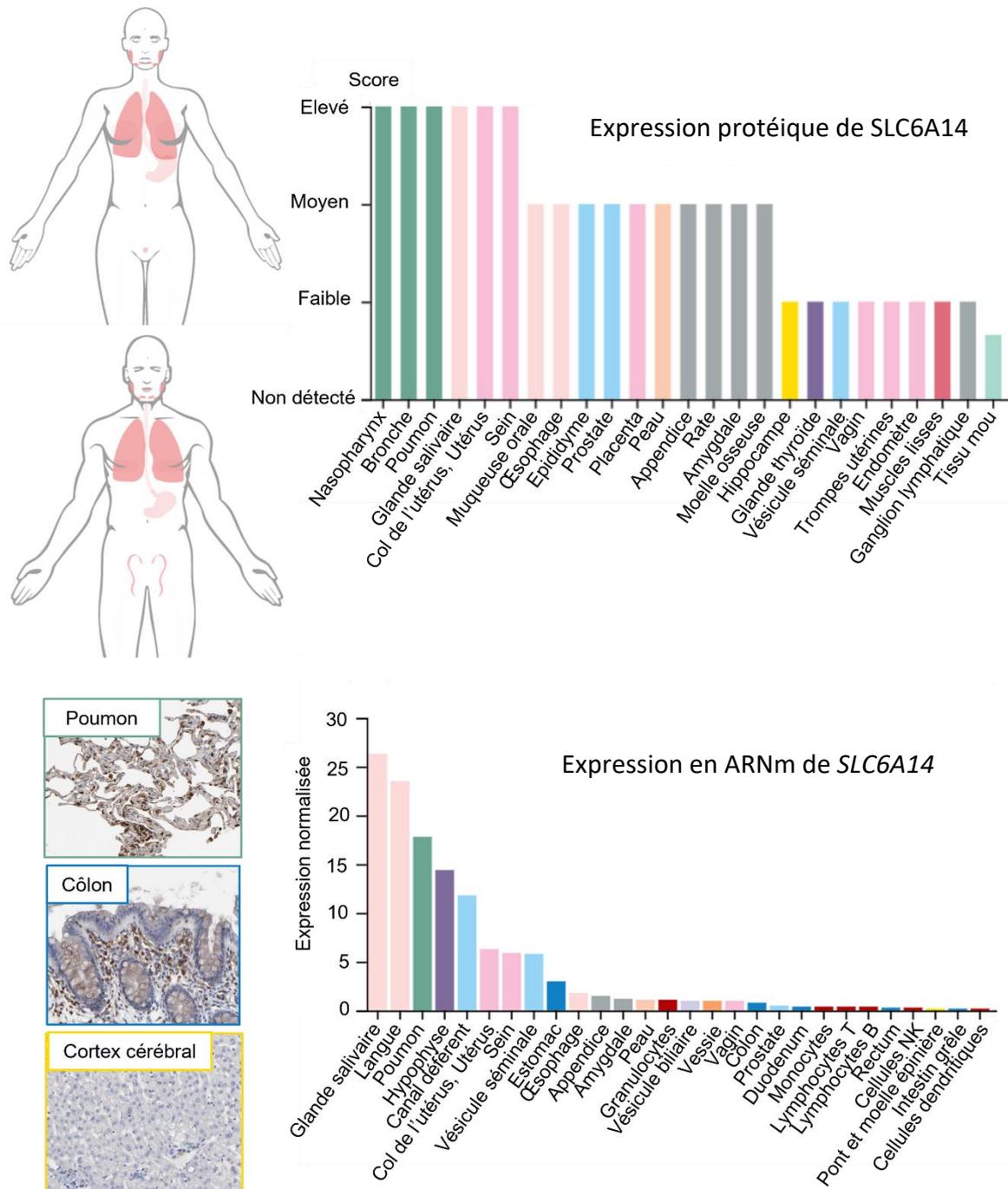


Figure 24. Expressions différentielles de l'ARNm de *SLC6A14* et de la protéine SLC6A14 en fonction des différents tissus humains. Adapté de *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000268104-SLC6A14/tissue>).

Les données de puces à ADN et de séquençage d'ARN obtenues auprès de la ressource publique Expression Atlas confirment que *SLC6A14* et *slc6a14* sont principalement exprimés dans les tissus pulmonaires humains et de souris, respectivement (**Table 4**). D'autre part *SLC6A14* est également détecté, bien qu'à de faibles niveaux, dans des tissus gastro-intestinaux tels que l'intestin et le côlon.

A. Human																								
Study	Lung	Salivary glands	Stomach	Vermiform appendix	Breast	Lower leg skin	Prostate gland	Urinary bladder	Vagina	Skin	Gall bladder	Duodenum	Esophagus	Esophagus mucosa	Pituitary gland	Tonsil	Small intestine	Rectum	Large intestine	Fallopian tube	Colon	Kidney	Sex	Age
RNA-seq of coding RNA of 19 human tissues from fetuses with congenital defects (NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium)			0														1		1			1	mixed	fetuses
RNA-seq of coding RNA from tissue samples of 122 human individuals representing 32 different tissues (Uhlen's Lab)	63	28	11	7			4	6		4	3	2	2			2	1	1		1	1	0	N/A	adult
Strand-specific RNA-seq of 13 human tissues (Michael Snyder's lab for the ENCODE project)	42																0					0	mixed	adult
Illumina Body Map	23				6		2														0	0	N/A	N/A
RNA-seq from 53 human tissue samples (Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project)	14	30	0		1	6	1	0	5	5				2	2						0		mixed	N/A

B. Mouse											
Study	Lung	Testis	Vomerinasal organ	Skin	Olfactory epithelium	Kidney	Thymus	Strain	Sex	Age	
RNA-seq of the olfactory system of newborn mice			35		32			C57BL/6J	mixed	newborn	
RNA-seq of mouse DBA/2J x C57BL/6J	124						0,5	DBA/2J x C57BL/6J	N/A	adult	
Mammalian Kaessmann		3				0,6		C57BL7/6 and wild-type captured in Spain	mixed	adult	
RNA-seq of 9 tissues from an adult male C57BL/6 mouse	81	6		21		0	0	C57BL/6	male	adult	
Transcription profiling by high throughput sequencing of mouse brain, liver and the whole testis (Soumillon et al.)		3						C57BL/6	male	adult	
Strand-specific RNA-seq of nine mouse tissues	87	4				0		DBA/2J	N/A	N/A	
Strand-specific RNA-seq of nine mouse tissues	77	3				0		CD1	N/A	N/A	
Strand-specific RNA-seq of nine mouse tissues	58	3				0		C57BL/6	N/A	N/A	

Table 4. Expression du transcrite de *SLC6A14* chez l'homme (A) et de *slc6a14* chez la souris (B), exprimée en nombre de transcrits/million. La gradation de la couleur bleue illustre l'abondance relative de la transcription de *SLC6A14*. Extraits de notre revue ³³⁰, adaptés de *Expression Atlas* (<https://www.ebi.ac.uk>).

Il existe encore assez peu d'études concernant la synthèse, la maturation, le trafic ou encore la stabilité de SLC6A14 à la membrane plasmique. Le contrôle qualité du repliement du SLC6A14 dans le réticulum endoplasmique (RE) semble impliquer des interactions avec les protéines de choc thermique HSP70 et HSP90 ³³¹ tandis que le trafic de SLC6A14 du RE vers l'appareil de Golgi dépendrait de son interaction avec la protéine SEC24, reconnaissant l'isoforme C et le complexe Coatomer II (COPII) ³³². La même équipe de recherche avait précédemment démontré que l'activation et la présence du transporteur SLC6A14 à la membrane plasmique étaient dépendantes de la protéine kinase C alpha (PKC α) ³³³. Les auteurs ont également réalisé des expériences de co-immunoprécipitation et d'immunofluorescence indiquant une interaction physique entre SLC6A14 et PKC α ³³³. Par ailleurs, Kovalchuk *et al.* ont montré que SLC6A14, surexprimé dans des cellules HEK293, était sensible à des enzymes de déglycosylation, et ont ainsi confirmé la présence d'une forme glycosylée de SLC6A14 à la membrane plasmique ³³². Les connaissances actuelles sur les mécanismes de trafic de SLC6A14 à la membrane plasmique ont été revues en détail par Nałecz en 2020 ³³⁴ et sont représentées dans la **Figure 25**.

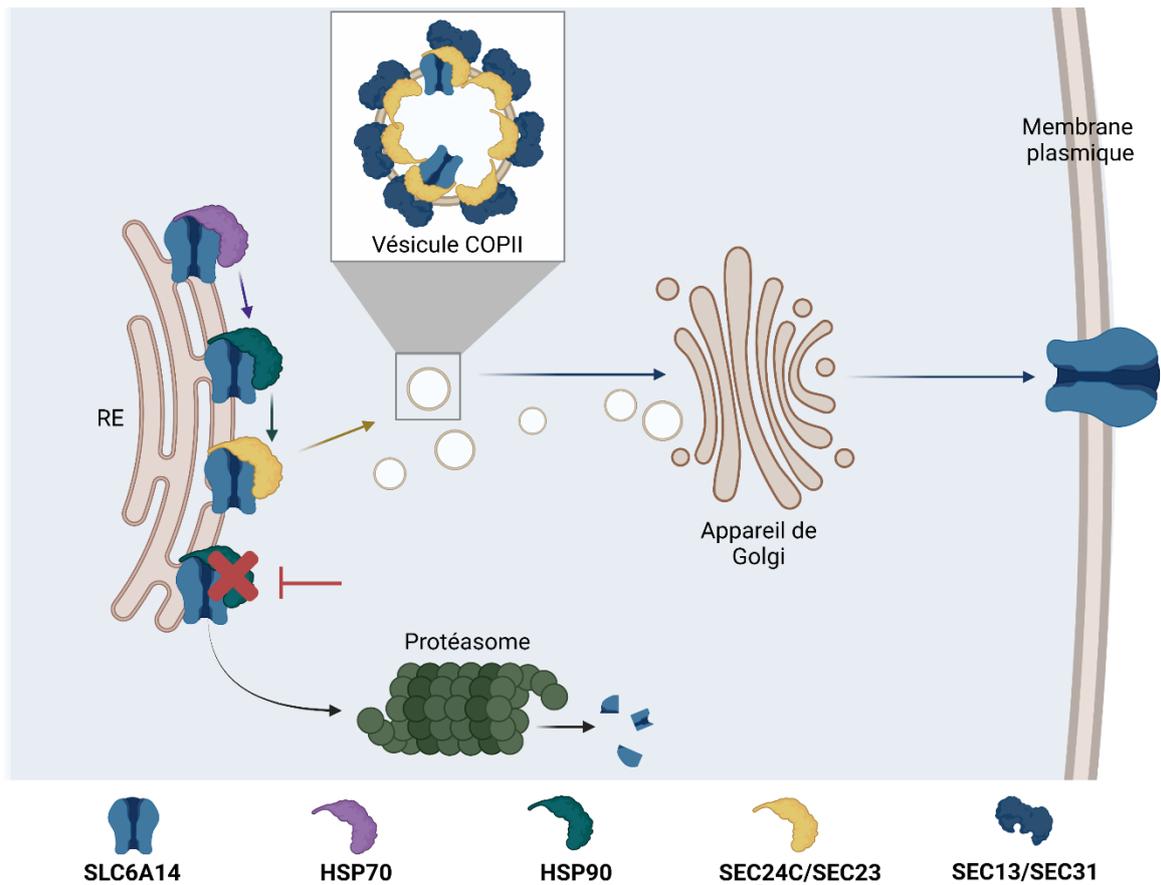


Figure 25. Trafic de SLC6A14 du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique. Adapté de Nałecz, 2020³³⁴. La liaison séquentielle de HSP70, HSP90 et SEC24C dans un dimère SEC24/SEC23 est représentée dans la partie gauche. L'inhibition de HSP90 entraîne la dégradation de SLC6A14 par le protéasome (en bas, à gauche). Les vésicules Coatamer II (COPII) sont représentées sous forme de cercles lorsque les vésicules se déplacent entre le RE et l'appareil de Golgi.

2. Expression et régulation de SLC6A14 dans le tractus gastro-intestinal

Dans le tractus gastro-intestinal humain, SLC6A14 semble être exprimé de façon hétérogène (**Table 5**).

Sloan *et al.* ont été les premiers à détecter l'ARNm de *SLC6A14* dans l'estomac, bien que ses niveaux soient significativement inférieurs à ceux observés dans les échantillons pulmonaires³²⁸. Deux études ont ensuite détecté des transcrits de *SLC6A14* dans des biopsies de muqueuses du duodénum et du rectum, respectivement^{335,336}

Sample	Tissues/cell types	mRNA	Protein
Tissues	Intestinal epithelium (cholera patients)	Expressed	Expressed (IHC)
	Gastrointestinal tissues	Expressed	–
Cell lines	Caco-2	Expressed	–
		Undetectable	–
	–	Expressed (WB & IF)	
	Not expressed (PCR)	Not expressed (WB)	
	CCD841, HCT116, HT29, LS174T	–	Expressed (WB)

Table 5. Expression du gène *SLC6A14* au niveau transcriptionnel et protéique dans le tractus gastro-intestinal humain. Caco-2, HT29 et LS174T : lignées cellulaires épithéliales d'adénocarcinome colorectal humain ; CCD841 : lignée cellulaire épithéliale de côlon humain normal ; HCT116 : lignée cellulaire épithéliale de carcinome colorectal. IHC : immunohistochimie, WB : *western blot*, IF : immunofluorescence, PCR : *polymerase chain reaction*. Extrait de Ruffin *et al.*, 2020³³⁰.

Enfin, Anderson *et al.* ont comparé l'expression de l'ARNm de *SLC6A14* dans tout le tractus gastro-intestinal et ont montré que l'estomac, le duodénum et le côlon descendant exprimaient des niveaux élevés d'ARNm de *SLC6A14*, tandis que de faibles niveaux ont été trouvés dans le jéjunum, l'iléon, le côlon ascendant et le côlon transverse³³⁷. Des résultats contradictoires ont été obtenus sur l'expression de *SLC6A14* dans la lignée de cellules épithéliales du côlon humain Caco-2, faisant état ou non de transcrits *SLC6A14* ou de protéines *SLC6A14*^{336–339}.

In vivo, l'expression de l'ARNm de *Slc6a14* est négligeable dans l'iléon de souris témoins, mais est fortement induite dans les cellules iléales épithéliales de souris CF³⁴⁰.

In vitro, il a été démontré que l'expression de *SLC6A14* peut être modulée par plusieurs facteurs tels que des toxines, des constituants bactériens ou des cytokines pro-inflammatoires. En effet, Flach *et al.* ont montré que la niveaux d'ARNm de *SLC6A14* sont significativement augmentés après 18h de stimulation avec la toxine cholérique dans les cellules Caco-2³³⁶. Il a également été démontré que d'autres molécules régulent l'expression de *SLC6A14*. Par exemple, l'induction de la transcription de *SLC6A14* par le L-tryptophane a été démontrée dans des cellules intestinales porcines³⁴¹. Ikpa *et al.* ont également montré que le traitement antibiotique des souris CF induit une réduction importante des transcrits *Slc6a14* dans les cellules épithéliales iléales³⁴⁰.

3. Expression et régulation de *SLC6A14* au niveau pulmonaire

Avant que l'ARNm de *SLC6A14* et la protéine associée soient identifiés dans le poumon humain, Galietta *et al.* ont démontré la présence d'un transport d'acides aminés dépendant de Na^+ au niveau de la membrane apicale de cellules épithéliales bronchiques isolées de sujets

atteints de mucoviscidose ou non³⁴². Après avoir montré que l'ARNm de *SLC6A14* était fortement exprimé dans le poumon et la trachée humains par rapport à d'autres organes³²⁸, Sloan *et al.* ont également montré que la protéine SLC6A14 était exprimée dans les fractions membranaires des voies respiratoires humaines et des échantillons pulmonaires distaux de patients normaux, atteints d'emphysème ou de mucoviscidose³⁴³. Différentes masses moléculaires de la protéine SLC6A14 ont été détectées dans les voies respiratoires et dans le poumon distal, vraisemblablement dues à des modifications post-traductionnelles. Plusieurs études ont également montré l'expression de *SLC6A14* dans diverses lignées cellulaires épithéliales des voies aériennes supérieures et inférieures, ainsi que dans les cellules épithéliales bronchiques primaires (**Table 6**).

Sample	Tissue/cell types	mRNA	Protein
Tissues	Lung tissue samples		Expressed (WB)
Cell lines	Calu-3	Expressed (qPCR)	–
	NCI-H69	Expressed (qPCR)	–
	A549, BEAS-2B	Barely detectable (qPCR)	Undetected (WB)
	Calu-3, NCI-H441	Expressed (qPCR)	Expressed (WB)
	Calu-3, CFBE41o-	Expressed (qPCR)	–
	A549	–	Expressed (WB)
Primary cells	Alveolar type 2 cells isolated from control and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) lung tissue	Expressed. Reduced in IPF cells (scRNAseq, qPCR)	–
	Bronchial epithelial cells isolated from posttransplant tissue from healthy donors and CF patients	Expressed (qPCR)	–

Table 6. Expression du gène *SLC6A14* au niveau transcriptionnel et protéique dans le tractus respiratoire humain.. Calu-3 : lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire humain ; NCI-H69 et A549 : lignées cellulaires de carcinome pulmonaire ; CFBE41o- : lignée cellulaire épithéliale bronchique humaine provenant d'un patient atteint de mucoviscidose. Extrait de Ruffin *et al.*, 2020³³⁰

Dans la lignée cellulaire alvéolaire A549, la protéine SLC6A14 est détectée ou non selon l'étude considérée^{344,345}. Di Paola *et al.* ont observé que les cellules primaires issues de patients atteints de mucoviscidose ou de donneurs sains présentaient des niveaux de transcrits de *SLC6A14* similaires³⁴⁶, suggérant que les variants pathogènes de *CFTR* n'ont aucun impact sur l'expression de l'ARNm de *SLC6A14*. De manière intéressante, un séquençage d'ARN (scRNAseq) réalisé dans une récente étude a révélé que l'expression de *SLC6A14* était réduite dans les pneumocytes de type II des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) par rapport aux témoins³⁴⁷. Les auteurs ont également montré que *SLC6A14* était exprimé dans les cellules basales, club et alvéolaires de type 2. *In vitro*, Gorrieri *et al.* ont observé une

augmentation de la quantité de transcrits de *SLC6A14* dans les cellules épithéliales bronchiques exposées à l'interleukine-4 (IL-4) ³⁴⁸. Dans la lignée de cellules épithéliales bronchiques glandulaires humaines Calu-3 et dans les cellules épithéliales bronchiques humaines primaires, la flagelline (FLA) ou le lipopolysaccharide (LPS) provenant de *P. aeruginosa* augmentent l'expression de l'ARNm de *SLC6A14* ³⁴⁶. Enfin, une étude utilisant des cellules HEK-293 surexprimant *SLC6A14* a montré que l'expression de la protéine SLC6A14 était réduite par les concentrations supra pharmacologiques d'Ivacaftor ou Vx-770, un potentialisateur de CFTR utilisé lors de la thérapie protéique de la mucoviscidose ³⁴⁹.

b. Expression du gène *SLC6A14* dans les pathologies humaines

Il a été démontré que SLC6A14 est surexprimé de manière différentielle dans plusieurs contextes pathologiques (**Table 7**), en particulier dans les cancers et les maladies coliques, revus en détails par Sikder *et al.* ³⁵⁰.

Disease		SLC6A14 expression	Methods
Cancer	Cervical	Up-regulated	PCR, IF/IH, HIS
	Colorectal	Up-regulated	PCR, Northern blot, IH
	Pancreatic	Up-regulated	Microarray, qPCR, WB, IF, IH
	Breast (ER +)	Up-regulated	PCR, IF
Colonic diseases	Crohn's disease	Up-regulated	qPCR
	Ulcerative colitis	Up-regulated	qPCR, microarray
	Long vs. short duration of ulcerative colitis	Down-regulated	Microarray
	Ischemic or infectious colitis	Up-regulated	qPCR
Cholera	Acute vs. convalescence phase	Up-regulated	Microarray, qPCR, IH
IPF	IPF	Down-regulated	scRNAseq
	IPF vs. NSIP	Up-regulated	Microarray

Table 7. Expression du gène *SLC6A14* au niveau transcriptionnel et protéique dans d'autres pathologies humaines. ER+: *estrogen receptor-positive*; IPF: *idiopathic pulmonary fibrosis*; NSIP: *non-specific interstitial pneumonia*; IH: *immunohistochemistry*; HIS: *hybridation in situ*. Lorsque ce n'est pas précisé, l'expression du gène *SLC6A14* au niveau transcriptionnel ou protéique est comparée à celle retrouvée chez des individus contrôles non atteints de la maladie en question. Extrait de Ruffin *et al.*, 2020³⁵⁰.

1. *SLC6A14* et cancer

SLC6A14 est significativement surexprimé dans les tissus du cancer du sein cervical ³⁵¹, colorectal ³⁵²⁻³⁵⁴, pancréatique ³⁵⁵⁻³⁵⁷ et à récepteurs d'œstrogènes positifs (ER +) ³⁵⁸. Dans le cancer du sein ER +, une expression élevée de l'ARNm de *SLC6A14* a été corrélée à une meilleure survie chez les patientes ³⁵⁹. À l'aide d'un modèle murin de cancer du sein spontané, Babu *et al.* ont montré que son développement et sa progression étaient significativement diminués lorsque les souris étaient croisées avec des souris déficientes pour *Slc6a14* (*Slc6a14*^{-/-}) ³⁶⁰. Les mécanismes moléculaires associés à ces régulations à la hausse ou à la

baisse sont largement inconnus. Il a été démontré que l'expression de *SLC6A14* est régulée par les œstrogènes³⁵⁸, expliquant sa surexpression spécifique du ER+, et non retrouvée dans le cancer du sein ER-. D'autre part, une corrélation entre une diminution de l'expression de l'ARNm de *SLC6A14* et une augmentation des niveaux du microARN (miR)-23a a été observée^{361,362}, suggérant un potentiel effet régulateur de ce miR sur notre gène d'intérêt. Cependant, aucune étude fonctionnelle (utilisant un miR de synthèse – mimic – ou des inhibiteurs de miR – antagomiR) n'a confirmé l'implication du miR-23a dans la régulation de l'expression de *SLC6A14*. En revanche, la corrélation inverse de miR-23b-3p³⁶³ et l'expression de *SLC6A14* a été récemment confirmée. Des études fonctionnelles ont montré que la régulation négative de *SLC6A14* observée dans des cellules résistantes à la thérapie endocrinienne (cancer du sein ER+) est associée à une augmentation de l'expression du miR23b-3p³⁵⁹.

2. *SLC6A14* et maladies coliques

Les niveaux d'ARNm de *SLC6A14* sont significativement plus élevés dans les échantillons de muqueuses coliques obtenus auprès de patients atteints de la maladie de Crohn par rapport aux témoins³⁶⁴. L'expression de *SLC6A14* est également supérieure dans les biopsies rectales et coliques de patients atteints de colite ulcéreuse ou de colite infectieuse/ischémique par rapport aux témoins, ce qui suggère que la régulation positive de *SLC6A14* pourrait être le résultat du contexte inflammatoire plutôt qu'une conséquence physiopathologique spécifique de la colite ulcéreuse^{336,364-366}. Low *et al.* ont en outre observé que *SLC6A14* était régulé à la baisse dans les biopsies coliques de patients présentant une colite ulcéreuse de longue durée par rapport aux patients de courte durée³⁶⁷. Chez le rat, D'Argenio *et al.* ont montré que la colite expérimentale induisait une diminution marquée de l'expression du transcrite de *Slc6a14* dans le côlon³⁶⁸. Enfin, Kou *et al.* ont constaté que les lignées cellulaires du cancer du côlon surexprimaient *SLC6A14* par rapport aux cellules normales du côlon³³⁹.

3. *SLC6A14* et fibrose pulmonaire idiopathique

SLC6A14 s'est révélé être régulé à la baisse dans les cellules de type alvéolaire II de patients atteints de FPI³⁴⁷, alors qu'il est surexprimé dans les échantillons provenant de poumons explantés de patients atteints de pneumonie interstitielle non spécifique par rapport aux échantillons provenant de patients atteints de FPI³⁶⁹.

4. *SLC6A14* et maladies infectieuses

Il a été démontré que les niveaux d'ARNm de *SLC6A14* sont plus importants dans les biopsies de duodénum recueillies pendant la phase aiguë du choléra par rapport aux niveaux observés dans les biopsies recueillies pendant la phase de convalescence³³⁶.

5. *SLC6A14*, obésité et infertilité

Certains variants génétiques (SNP) de *SLC6A14* ont été associés à une variabilité phénotypique d'autres pathologies humaines telles que l'obésité ou l'infertilité (**Table 8**).

rs ID (alleles)	MAF	Variant localization	Association with	Number of patients/cohort characteristics
rs2312054 (A/T)	0.21	<i>SLC6A14</i> intron	Food intake	344 children, age 7–8 years
rs12391221 (C/A)	0.30	<i>SLC6A14</i> intron	Food intake	344 children, age 7–8 years
rs2071877 (C/T)	0.30	<i>SLC6A14</i> intron	Obesity	1267 obese adults and 649 lean controls (French)
rs2011162 (C/G)	0.45	<i>SLC6A14</i> exon 14; 3'UTR	Adiposity	344 children, age 7–8 years
			Obesity	Two independent cohorts: 117 obese and 182 controls (Finnish); 837 obese and 968 controls (Finnish and Swedish)
			Obesity	1267 obese adults and 649 lean controls (French)
			Reduced fat oxidation in women	722 obese subjects of white European origin (541 women, 181 men), age 20–25 years
			Male infertility	370 infertile men and 241 fertile controls (Macedonian and Slovenian)
rs2312054(A)/ rs2071877(C)/ rs2011162(G) haplotype			Male infertility	370 infertile men and 241 fertile controls (Macedonian and Slovenian)

Table 8. Associations entre le génotype de *SLC6A14* et les phénotypes tels que l'obésité ou l'infertilité. Les allèles soulignés sont les allèles mineurs. MAF : *minor allele frequency*. Les données ont été collectées sur la base de données *Ensembl, 1000 Genomes, European population*. Extrait de Ruffin *et al.*, 2020³³⁰.

Des SNP de *SLC6A14* ont été associés à l'obésité dans différentes populations (**Table 8**). Dans une analyse de gènes candidats, répliquée plus tard dans une cohorte indépendante, Suviolahti *et al.* ont trouvé des différences significatives dans les fréquences des allèles du SNP rs2011162 entre les sujets obèses et non obèses³⁷⁰. Une autre étude a suggéré une association entre le rs2011162 et l'oxydation des acides gras chez des femmes non habituées à un régime riche en graisses, pouvant être responsable d'une prise de poids au cours du temps³⁷¹. Enfin, dans une étude de cohorte familiale française comprenant 1 267 adultes obèses et 649 sujets témoins maigres, Durand *et al.* ont trouvé une association significative entre le SNP rs2011162 et l'obésité. Ils ont observé que l'allèle à risque était associé à des niveaux de graisse corporelle plus élevés et à une perception modifiée de la faim et de la satiété chez les femmes adultes obèses modérées et chez les filles obèses³⁷². Durand *et al.* ont également identifié une association entre le SNP rs2071877 et l'obésité dans une cohorte française³⁷². Ce SNP a également été associé à la somme de l'épaisseur des triceps et des plis cutanés sous-scapulaires, une mesure objective de l'adiposité, chez les garçons de 7 à 8 ans³⁷³. Enfin, Miranda *et al.* ont également démontré l'association entre deux autres SNP de *SLC6A14*, rs2312054 et rs12391221, et plusieurs paramètres utilisés pour évaluer l'apport alimentaire chez les enfants

³⁷³.

Le polymorphisme de *SLC6A14* a également été associé à l'infertilité masculine. En effet, Noveski *et al.* ont constaté que l'haplotype rs2011162 seul et rs2011162(G)/rs2071877(C)/ rs2312054(A) étaient répartis différemment entre les groupes fertiles et infertiles de leur cohorte³⁷⁴. Comme le SNP rs2011162 est situé dans la région 3'UTR de *SLC6A14*, les auteurs ont étudié les conséquences possibles de ce variant sur la structure secondaire de l'ARN. Un effet structurel significatif du SNP rs2011162 a été retrouvé, pouvant entraîner une expression d'ARNm différentielle en fonction de l'allèle.

6. *SLC6A14* et mucoviscidose

a) Etudes d'association génétique

Nous allons à présent nous intéresser plus particulièrement à *SLC6A14* en tant que gène modificateur de la mucoviscidose. Compte tenu de la diversité de la sévérité phénotypique chez les patients atteints de mucoviscidose présentant les mêmes variants de *CFTR*, plusieurs études génétiques ont été menées pour identifier les gènes modificateurs de la mucoviscidose. Parmi les loci identifiés, un locus situé sur le chromosome X, près du gène *SLC6A14*, a été associé à une variabilité de la sévérité des manifestations cliniques de la maladie, incluant la sévérité de l'atteinte respiratoire, des infections pulmonaires, l'apparition d'un IM ou la survenue de symptômes digestifs (**Table 9**). Le schéma de déséquilibre de liaison de différents variants génétiques ayant fait l'objet de récentes études est présenté dans la **Figure 26**.

rs ID (Alleles)	MAF	Variant localization	Association with	Number of CF patients	Cohort/patients characteristics
rs7879546 (T/C)	0.41	Intergenic	Lung disease severity	6365	Mean age: 19.5 years; PI (99.8%); F508del homozygotes (65%)
rs5905376 (C/A)	0.23	Intergenic	Lung disease severity		
rs5952223 (C/T)	0.23	Intergenic	Lung disease severity		
rs12839137 (G/A)	0.12	Intergenic	Presence of meconium ileus	6135	
rs5905283 (A/C)	0.47	Intergenic (2 KB Upstream Variant)	No association with pediatric lung disease severity	815	Mean age of lung function measurements: 12.63 years; F508del homozygotes: 62.3%
			No association with age of first infection by <i>P. aeruginosa</i>	730	Median age at first detection of positive <i>P. aeruginosa</i> culture: 5.55 years; F508del homozygotes: 61%
			No association with early exocrine pancreatic disease	126	Median age of the first available IRT measurement: 0.36 years; F508del homozygotes: 60.3%
			No association with early exocrine pancreatic damage	111	Patients from Colorado, median age at IRT measurement: 2 days; F508del homozygotes: 56%
			Presence of meconium ileus	6,135	Two independent cohorts (patients with two severe <i>CFTR</i> mutations): 3,763 North American (F508del homozygotes 71.4%) and 2,372 French (> 6 years old) and American patients
			Pediatric lung disease severity	815	Mean age of lung function measurements: 12.63 years; F508del homozygotes: 62.3%
			No association with age of first infection by <i>P. aeruginosa</i>	730	Median age at first detection of positive <i>P. aeruginosa</i> culture: 5.55 years; F508del homozygotes: 61%
			No association with early exocrine pancreatic phenotypes	126	Median age of the first available IRT measurement: 0.36 years; F508del homozygotes: 60.3%
rs3788766 (G/A)	0.36	Regulatory region	No association with early exocrine pancreatic damage	111	Patients from Colorado, median age at IRT measurement: 2 days; F508del homozygotes: 56%
			Presence of meconium ileus	6,135	Two independent cohorts (patients with two severe <i>CFTR</i> mutations): 3,763 North American (F508del homozygotes 71.4%) and 2,372 French (> 6 years old) and American patients
			Pediatric lung disease severity	815	Mean age of lung function measurements: 12.63 years; F508del homozygotes: 62.3%
			Age of first infection by <i>P. aeruginosa</i>	730	Median age at first detection of positive <i>P. aeruginosa</i> culture: 5.55 years; F508del homozygotes: 61%
			No association with early exocrine pancreatic phenotypes	126	Median age of the first available IRT measurement: 0.36 years; F508del homozygotes: 60.3%
			No association with early exocrine pancreatic damage	111	Patients from Colorado, median age at IRT measurement: 2 days; F508del homozygotes: 56%
			Early pulmonary symptoms	79	Brazilian patients
			<i>P. aeruginosa</i> infection	83	
Presence of meconium ileus	6,770	Patients with two severe <i>CFTR</i> mutations associated with PI; F508del homozygotes: 64.2%			
rs12710568 (G/C)	0.31	Regulatory region	Presence of meconium ileus	6,770	Patients with two severe <i>CFTR</i> mutations associated with PI; F508del homozygotes: 64.2%
rs5905177 (C/T)	0.35	<i>SLC6A14</i> intron	Presence of meconium ileus		

Table 9. Associations entre le génotype de *SLC6A14* et les phénotypes digestifs et respiratoires de la mucoviscidose. Les données ont été collectées sur la base de données *Ensembl, 1000 Genomes, European population*. IRT : immunoreactive trypsinogen ; PI : pancreatic insufficiency. Extrait de Ruffin *et al.*, 2020³³⁰

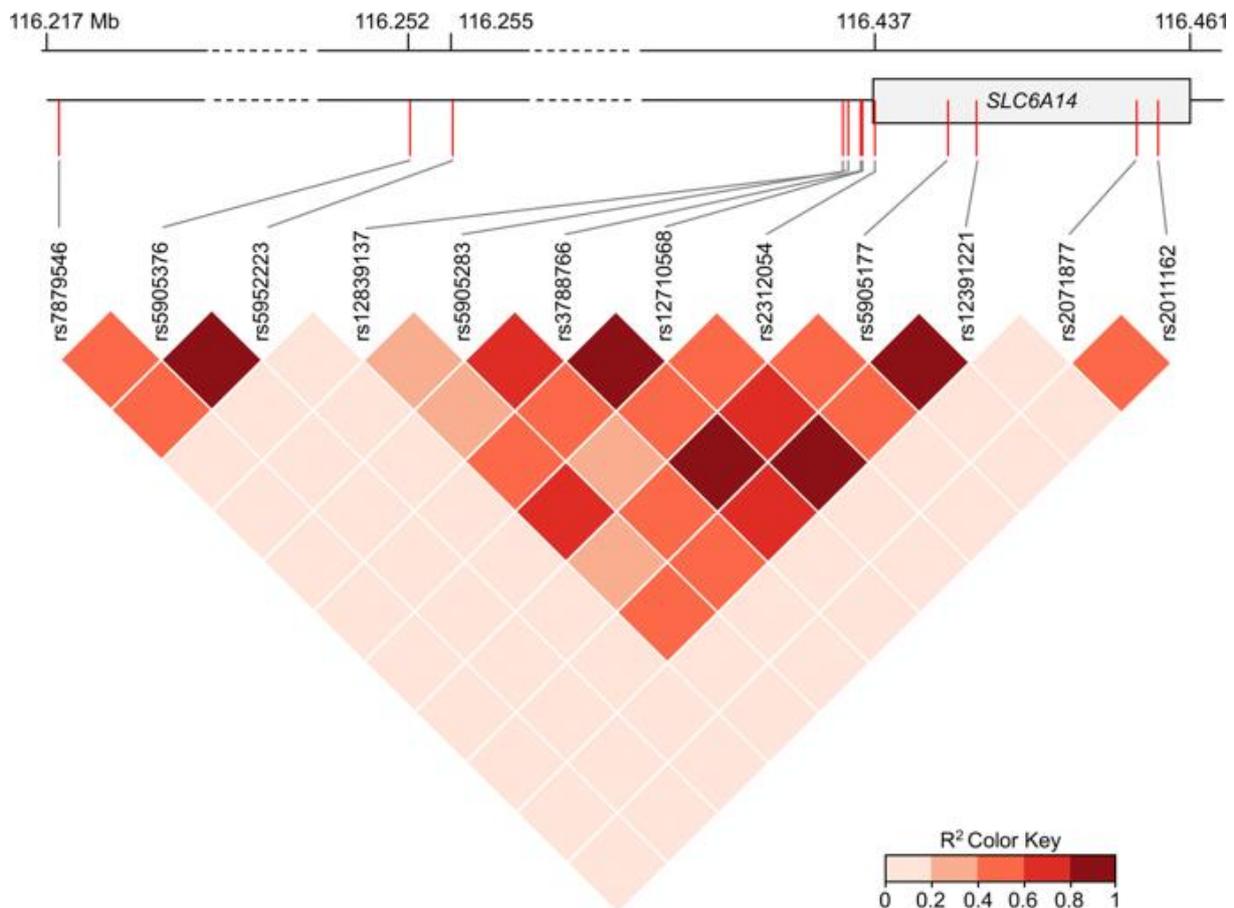


Figure 26. Modèle de déséquilibre de liaison (DL) des douze variants génétiques de *SLC6A14* étudiés. Les carrés rouges foncés indiquent des DL forts. Les R² proviennent du site <https://ldlink.nci.nih.gov>, figure extraite de Ruffin *et al.*, 2020.

Les premiers indices indiquant que *SLC6A14* pouvait être un gène modificateur de la mucoviscidose ont été décrits par Sun *et al.* dans une «étude d'association pangénomique» (GWAS) impliquant 6 135 patients atteints de mucoviscidose³²⁷. Cette étude a identifié une association significative entre la sensibilité à l'IM et trois variants génétiques de *SLC6A14* : rs12839137, rs5905283 et rs3788766.

Dans une autre étude portant sur plus de 6 700 patients atteints de mucoviscidose du Consortium international pour les gènes modificateurs de la mucoviscidose, Gong *et al.* ont récemment confirmé l'association entre la sensibilité à l'IM et le rs3788766³²². Cette étude a également identifié une association entre la sensibilité à l'IM et deux autres SNP (rs12710568 et rs5905177) situées dans la région régulatrice et dans l'intron de *SLC6A14*, respectivement. Plusieurs groupes ont effectué une analyse d'association sexospécifique basée sur le fait que le gène *SLC6A14* est situé dans la région associée à une inactivation aléatoire du chromosome X^{322,327}. De manière intéressante, des odd ratio plus élevés chez les hommes que chez les femmes ont été montrés, et ce uniquement pour les variants génétiques associés à la sensibilité à l'IM.

Ces résultats indiquent une susceptibilité d'être atteint d'un IM plus importante chez les hommes que chez les femmes.

Par ailleurs, Li *et al.* ont évalué l'association des variants génétiques de *SLC6A14* liés à l'IM (ou « allèles à risque » d'IM) avec d'autres comorbidités des patients atteints de mucoviscidose, telles que la sévérité de l'atteinte pulmonaire et l'âge à la première colonisation des voies aériennes par *P. aeruginosa*³²³. Leur étude a porté sur 815 enfants mucoviscidosiques canadiens qui ont été génotypés pour les SNPs rs12839137, rs5905283 et rs3788766. Parmi les variants de *SLC6A14* étudiés, les allèles à risque rs5905283 et rs3788766 étaient associés à la sévérité de l'atteinte pulmonaire pédiatrique ; tandis que le variant rs3788766 était associé à l'âge de la première infection par *P. aeruginosa*. Les mêmes résultats ont été retrouvés ultérieurement dans une cohorte plus petite³²⁵. En 2015, un GWAS impliquant 6 365 patients a confirmé que le polymorphisme de *SLC6A14* modifiait la sévérité de la fonction respiratoire chez les patients atteints de mucoviscidose³¹⁴. En effet, les auteurs ont trouvé une association significative entre les génotypes de trois variants intergéniques de *SLC6A14* (rs7879546, rs5905376 et rs5952223) et la sévérité de la fonction respiratoire.

Gong *et al.* ont récemment intégré les données de GWAS et l'expression génique tissu-spécifique afin de déterminer si les loci modificateurs du chromosome X (englobant *SLC6A14*) influencent les niveaux d'expression d'ARNm de *SLC6A14* dans différents tissus³²². Leurs résultats ont montré une corrélation entre la présence de SNP associés à l'atteinte pulmonaire ou à l'IM et l'expression de l'ARNm de *SLC6A14* dans des épithéliums nasaux CF et dans le pancréas, respectivement. Cela suggère que chaque locus a un impact sur l'expression de *SLC6A14* avec une spécificité tissulaire. De plus, aucune association entre les SNPs de *SLC6A14* et le phénotype pancréatique exocrine précoce ou les niveaux de trypsine immunoréactive à la naissance n'a été trouvée^{323,324}.

b) Rôle biologique de la protéine SLC6A14 dans la mucoviscidose : hypothèses

Plusieurs études ont montré que *SLC6A14* joue un rôle principal en tant que transporteur d'acides aminés dans diverses cellules et modèles épithéliaux^{342,375–379}. Les données d'expression de *SLC6A14* dans les études humaines et génétiques suggèrent que *SLC6A14* pourrait avoir un rôle important dans la physiopathologie intestinale et pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose.

i. Fonction au niveau gastro-intestinal

Ahmadi *et al.* ont également mené une autre étude afin de déterminer la fonction biologique de Slc6a14 dans le tractus gastro-intestinal murin³⁸⁰. Ils ont d'abord démontré que Slc6a14 est un transporteur majeur d'acides aminés apicaux dans le côlon murin. En effet, les souris *Slc6a14*^(-/-) ont présenté une réduction de près de 75 % du transport de l'arginine apicale par rapport aux souris de type sauvage (WT). Chez les souris CF, la délétion de *Slc6a14* induit une réduction de la prise de poids et de l'IMC après le sevrage et aggrave le phénotype intestinal, avec une diminution de la sécrétion de fluides médiée par F508del-CFTR. L'étude *in vitro* réalisée par ces auteurs sur des organoïdes intestinaux de souris souligne d'une part le fait que Slc6a14 ne semble pas affecter le traitement ou la stabilité de F508del-CFTR. D'autre part, l'altération de l'absorption d'arginine par les cellules épithéliales intestinales délétées pour *Slc6a14* induit à la fois une diminution de la production de monoxyde d'azote (NO) et une régulation aberrante du GMP cyclique, qui favorise en conditions normales la fonction de CFTR. Ces résultats suggèrent qu'une augmentation de l'activité de Slc6a14 peut augmenter la production de NO et l'activité résiduelle de F508del-CFTR dans les tissus CF. Cependant, la conservation de ces mécanismes chez l'homme reste à démontrer.

Il convient de souligner que dans le poumon ou l'intestin, des études fonctionnelles ont été menées avec des expériences de surexpression (plasmide) ou d'inhibition (siARN) du gène entier. Le rôle des variants génétiques spécifiques identifiés dans les études génétiques n'est pas encore connu et reste à élucider.

ii. Fonction au niveau pulmonaire

Au niveau pulmonaire, il a d'abord été suggéré que le transport apical des acides aminés dans les cellules épithéliales des voies respiratoires pourrait jouer un rôle important dans la résolution des infections³⁴². En effet, les agents pathogènes ayant besoin d'acides aminés, le transport apical de ces derniers permettraient de limiter la croissance et/ou la prolifération des micro-organismes pathogènes au sein des voies respiratoires. Les auteurs de cette étude ont suggéré que le transporteur d'acides aminés à la membrane apicale pourrait être activé après l'infection, permettant ainsi de diminuer rapidement la concentration en acides aminés du liquide de surface des voies aériennes (**Figure 27**). Ce phénomène pourrait alors contribuer à lutter contre les infections. Cette hypothèse est appuyée par les caractéristiques uniques de SLC6A14 qui lui permettent de concentrer fortement tous les acides aminés essentiels dans le cytoplasme des cellules épithéliales.

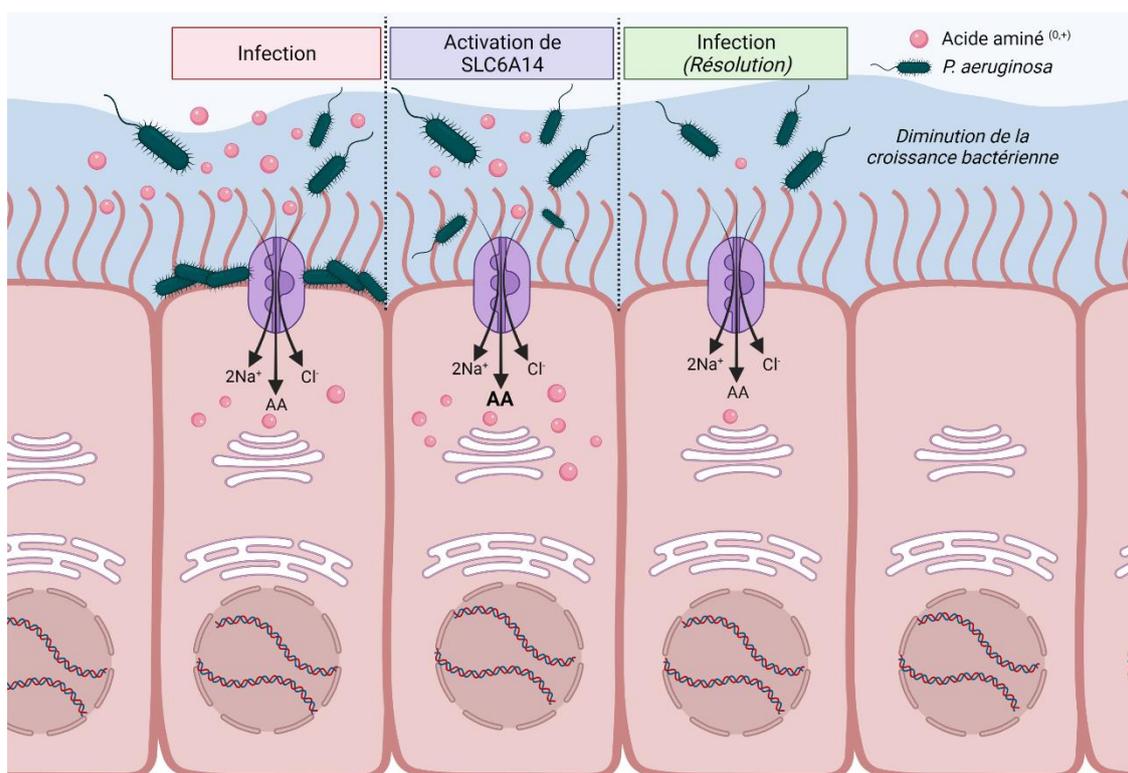


Figure 27. Rôle supposé du transporteur SLC6A14 dans le poumon en réponse à l'infection par *P. aeruginosa*.

Comme le polymorphisme de *SLC6A14* a été associé à l'âge de la première colonisation par *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose, Di Paola *et al.* ont cherché à déterminer comment SLC6A14 pourrait influencer sur la colonisation des voies aériennes par ces bactéries³⁴⁶. D'après cette étude, l'exposition à la flagelline de *P. aeruginosa* augmente l'expression de l'ARNm de *SLC6A14* ainsi que sa fonction d'importation d'arginine dans des cellules Calu-3 et dans les cellules épithéliales des voies respiratoires primaires de patients atteints ou non de mucoviscidose. Cela pourrait donc théoriquement induire une diminution de la concentration en acides aminés dans l'ASL. Cette modification des niveaux d'acides aminés serait responsable d'une diminution de l'attachement de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales des voies respiratoires, tandis que la viabilité des formes planctoniques de *P. aeruginosa* ne semble pas impactée. De plus, les auteurs de cette même étude ont montré que l'inhibition pharmacologique de SLC6A14 augmentait l'attachement de *P. aeruginosa* à la surface de cellules épithéliales primaires issues de voies respiratoires non mucoviscidosiques et légèrement dans la lignée cellulaire épithéliale bronchique CFBE41o-³⁴⁶.

Par ailleurs, Ahmadi *et al.* ont récemment rapporté que le transport de l'arginine *via* SLC6A14 augmente l'efflux de Cl^- dans les cellules épithéliales des voies respiratoires de patients atteints de mucoviscidose porteurs du variant F508del, stimulées ou non avec du

Lumacaftor³³⁸. La potentialisation de la fonction du canal CFTR-F508del, due au transport d'arginine dépendant de SLC6A14, semble être produite *via* la voie de signalisation de NO (**Figure 28**) et induit une augmentation de la hauteur de l'ASL. Ainsi, l'activation de SLC6A14 pourrait être considérée comme une thérapie complémentaire à la correction et à la potentialisation de CFTR chez les patients atteints de mucoviscidose.

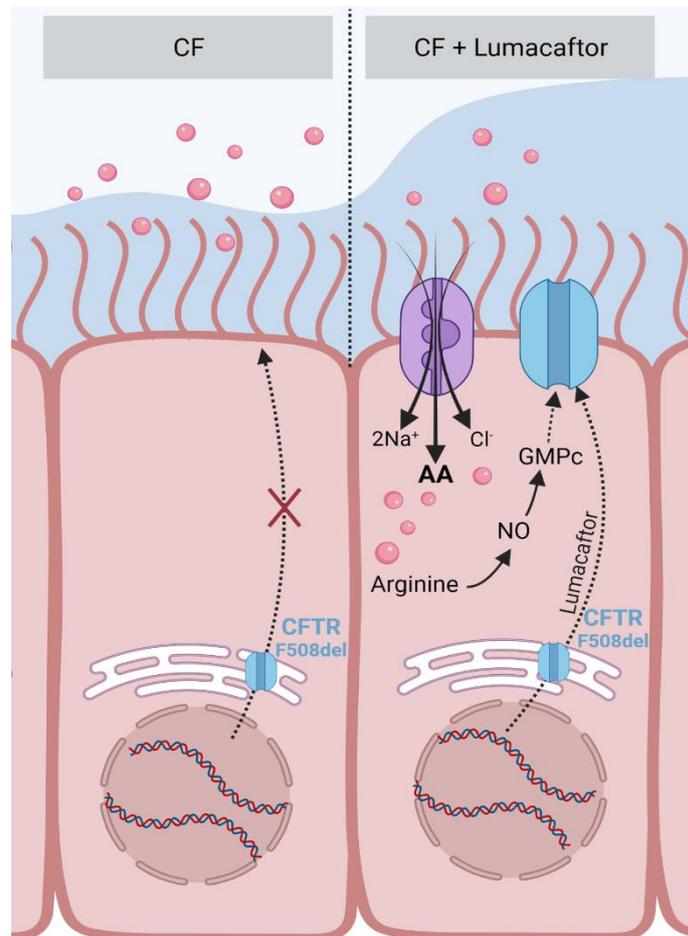


Figure 28. Lien présumé entre le transporteur SLC6A14, le canal CFTR et la voie de signalisation du NO.

Objectifs de l'étude

Plusieurs études ont montré que l'expression du gène *SLC6A14*, aux niveaux transcriptionnel et protéique, est régulée à la hausse ou à la baisse dans des conditions pathologiques. Cependant, les mécanismes impliqués dans ces dérégulations n'ont, pour la plupart, pas été élucidés.

De plus, des études génétiques mettent en évidence que les variants génétiques de *SLC6A14* modulent la sévérité des maladies digestives et pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose. La fonction biologique de ce gène modificateur pléiotrope n'est pas entièrement expliquée et les conséquences biologiques directes des variants identifiés dans les études génétiques restent à clarifier.

Certaines études ont démontré que des médiateurs inflammatoires et des molécules issues de microorganismes pathogènes peuvent avoir un impact sur l'expression de *SLC6A14*. D'autres études récentes suggèrent quant à elles que *SLC6A14* pourrait jouer un rôle important dans la réponse à l'infection respiratoire et dans la sécrétion de liquide liée à CFTR.

L'objectif de notre étude consiste donc à déterminer le rôle de *SLC6A14* dans la physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose. Nous étudierons dans un premier temps l'impact d'un variant génétique, localisé au niveau du locus rs3788766, sur l'expression génique de *SLC6A14*. Nous étudierons ensuite l'implication de ce transporteur dans la réparation épithéliale bronchique, processus dérégulé chez les patients atteints de mucoviscidose. Enfin, nous nous intéresserons à la régulation de l'expression du gène *SLC6A14*, aux niveaux transcriptionnel et protéique, en contextes inflammatoires et infectieux de la mucoviscidose.

Résultats

I- Etude d'association génétique de *SLC6A14* et mise en évidence de son rôle dans la voie de signalisation mTOR et la réparation épithéliale bronchique

a. Résumé

Dans cette étude, nous avons étudié si le SNP rs3788766, situé dans le promoteur de *SLC6A14*, est associé à la gravité de la maladie pulmonaire dans une grande cohorte française de patients atteints de mucoviscidose. Nous avons également étudié, d'une part, les conséquences de ce SNP sur l'activité du promoteur de *SLC6A14* en utilisant le gène rapporteur de la luciférase et, d'autre part, le rôle de *SLC6A14* dans la voie de signalisation mTOR et la réparation de l'épithélium des voies respiratoires. Nous confirmons que le SNP rs3788766 de *SLC6A14* est associé à la gravité de la maladie pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose ($p=0,020$; $n=3\ 257$, insuffisants pancréatiques, âgés de 6 à 40 ans), l'allèle mineur G ayant un effet délétère sur la fonction respiratoire. Dans des lignées cellulaires épithéliales bronchiques déficientes pour *CFTR* (Calu-3 *CFTR*-KD), l'activité du promoteur de *SLC6A14* est réduite en présence de l'allèle G du rs3788766. L'inhibition de *SLC6A14* par l' α -méthyltryptophane (α -MT), un bloqueur pharmacologique spécifique, a induit une diminution du transport d'arginine, des niveaux de phosphorylation de mTOR et des taux de réparation de l'épithélium bronchique.

En conclusion, notre étude suggère que le génotype de *SLC6A14* pourrait affecter la sévérité de la maladie pulmonaire chez les personnes atteintes de mucoviscidose *via* la phosphorylation de mTOR et des mécanismes de réparation épithéliale dans le poumon.

Ces résultats font l'objet d'une publication éditée en preprint sur *Research Square* <https://www.researchsquare.com/article/rs-591564/v1>, et est en cours de soumission.

*b. Article***SLC6A14 impacts cystic fibrosis lung disease severity via mTOR and epithelial repair modulation**

Julia Mercier¹, Claire Calmel¹, Julie Mésinè^{1,2}, Erika Sutanto^{3,4}, Fatiha Merabtene¹, Elisabeth Longchamp⁵, Edouard Sage⁶, Anthony Kicic^{3,4,7,8}, Pierre-Yves Boëlle², Harriet Corvol^{1,9}, Manon Ruffin^{1*}, Loïc Guillot^{1*}

¹Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint Antoine, CRSA, F-75012 Paris, France. ; ²Sorbonne Université, Inserm, Institut Pierre Louis d'épidémiologie et de Santé Publique, IPLESP, APHP, Hôpital Saint-Antoine, F-75012 Paris, France. ; ³Telethon Kids Institute, University of Western Australia, Nedlands, 6009, Western Australia, Australia.; ⁴School of Public Health, Curtin University, Bentley, 6102, Western Australia, Australia. ; ⁵Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Foch, Suresnes 92150, France ; ⁶Département de chirurgie thoracique et transplantation pulmonaire, Hôpital Foch, Suresnes 92150, France ; ⁷Centre for Cell Therapy and Regenerative Medicine, Medical School, The University of Western Australia, Nedlands, 6009, Western Australia, Australia. ; ⁸Department of Respiratory and Sleep Medicine, Perth Children's Hospital, Nedlands, 6009, Western Australia, Australia. ; ⁹AP-HP, Hôpital Trousseau, Service de Pneumologie Pédiatrique, F-75012 Paris, France. *co-last author

Corresponding author: Loïc Guillot, loic.guillot@inserm.fr

Abstract

Cystic fibrosis (CF), due to variants in *CFTR* gene, is associated with chronic infection/inflammation responsible for airway epithelium alteration and lung function decline. Modifier genes induce phenotype variability between people with CF (pwCF) carrying the same *CFTR* variants. Among these, the gene encoding for the amino acid transporter SLC6A14 has been associated with lung disease severity and age of primary airway infection by the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. In this study, we investigated whether the single nucleotide polymorphism (SNP) rs3788766, located within *SLC6A14* promoter, is associated with lung disease severity in a large French cohort of pwCF. We also studied the consequences of this SNP on *SLC6A14* promoter activity using a luciferase reporter and the role of SLC6A14 in mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway and airway epithelial repair. We confirm that *SLC6A14* SNP rs3788766 is associated with lung disease severity in pwCF (p=0.020; n=3,257, pancreatic insufficient, aged 6 to 40 years old), with the minor allele G being deleterious. In bronchial epithelial cell lines deficient for *CFTR*, *SLC6A14* promoter activity is reduced in the presence of the rs3788766 G allele. SLC6A14 inhibition with a specific pharmacological blocker reduced ³H-arginine transport, mTOR phosphorylation and bronchial epithelial repair rates in wound healing assays. To conclude, our study highlights that *SLC6A14* genotype might affect lung disease severity of people with cystic fibrosis via mTOR and epithelial repair mechanisms modulation in the lung.

Keywords: cystic fibrosis, lung function, modifier genes, SLC6A14, amino acid transporter, bronchial epithelial cells

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF), the most common lethal autosomal recessive genetic disease in the Caucasian population, results from pathogenic variants in the CF transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene [1-3]. Manifestations of CF occur in several organs including the pancreas, liver and the intestine [4-6], but lung disease is the main cause of morbidity and mortality in people with CF (pwCF). CF lung disease is characterized by chronic airway colonization with microorganisms, including the most common CF life-threatening pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, exacerbated inflammation and lung tissue damage due to abnormal repair of the airway epithelium [7].

Variability in the clinical phenotype of pwCF carrying identical *CFTR* variants and living in the same environment involves genetic modifiers, which are expected to contribute to almost 50% of CF lung phenotype [8]. In a large cohort of pwCF (n=6,365), we previously identified five CF lung disease modifier loci by genome wide association studies (GWAS) [9], including the solute carrier family 6 member 14 gene (*SLC6A14*, also known as *ATB*^{0,+}). *SLC6A14* is located on chromosome X and encodes for the neutral and cationic amino acid transporter SLC6A14 that concentrates amino acids into cells (with the exception of proline, glutamate and aspartate) by using a sodium and chloride electrochemical gradient [10-12]. This transporter has been shown to be upregulated in several cancers [13] and to be involved in cell growth, proliferation and the mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway [14].

The *SLC6A14* gene has pleiotropic effects in pwCF [13], with several *SLC6A14* single nucleotide polymorphisms (SNPs) being associated with different phenotypes such as meconium ileus (MI) occurrence, a severe neonatal intestinal obstruction [15], lung disease severity [9,16,17], and age at first *P. aeruginosa* infection [16,17]. In particular, the SNP rs3788766, located within the promoter region of *SLC6A14*, has been previously associated with both MI and lung function variability in pwCF [17,18,16]. However, the functional consequences of this SNP on SLC6A14 expression and function are still unknown.

Here, we first analyzed the association between *SLC6A14* SNP rs3788766 and lung function by genotyping a large French cohort of pwCF. Then, we studied how rs3788766 regulate transcriptional activity of the *SLC6A14* promoter. Finally, we investigated the possible consequences of SLC6A14 activity modulation in CF bronchial epithelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Genotype-phenotype association study

Participants

As of January 31st, 2021, 4,975 pwCF had been included in the French CF modifier gene study [9]. The study was approved by the French Human Ethics Committee (CPP n°2004/15), and information collected by the *Commission Nationale de L'informatique et des Libertés* (n°04.404). Informed written consent was obtained from each participant and/or parents or guardians. For the analysis, we excluded pancreatic-sufficient participants since they had milder disease (n = 820), non-genotyped participants for the *SLC6A14* SNP rs3788766 (n = 436), and participants without forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) measurements (n = 177). We also excluded participants under 6 years of age, since their spirometry data was less reliable, as well as those over 40 years old, in order to limit selective survival bias (n = 285).

Lung function and genotyping

Measurements of FEV₁ were quarterly collected according to international CF care recommendations [19] and expressed as percent-predicted values (ppFEV₁) using Global Lung Function Initiative (GLI) equations [20]. To assess the lung disease severity, FEV₁ were transformed to the Survival Adjusted Kulich Normalized (SaKnorm Z-value) CF-specific lung phenotype [21]. Lung function and lung disease severity were analyzed over the last 3 years; except for post-lung transplant patients and patients under CFTR modulator therapy (ivacaftor and lumacaftor-ivacaftor) for whom FEV₁ measurements were analyzed over the 3 years prior to the event. *SLC6A14* SNP rs3788766 was genotyped using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) chemistry (LGC, Teddington, UK).

Immunohistochemistry

Human lung biopsies were obtained from a healthy 51-year-old male smoker and from a 29 years old male with CF (homozygous for the F508del variant), respectively from Hôpital Foch, Suresnes 92150, France. Biopsies were collected and processed in compliance with the current French public health legislation (articles L.1235-2 and L.1245-2, code de la santé publique, www.legifrance.gouv.fr). The institution informed the participant and made sure that they were not opposed to the use of surgical samples for research purposes. Staining was performed using 5- μ m thick paraffin sections from formalin-fixed paraffin-embedded lung biopsies. Immunolabeling for *SLC6A14* was performed on a Bond-III® automat (Leica, Leica Biosystems, Nussloch, Germany) using anti-*SLC6A14* antibody (PA5-51855, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; 1:100).

Reagents

SLC6A14 inhibitor α -methyltryptophan (α -MT; M8377 was from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was solubilized in 100% methanol (MeOH) to achieve 1, 2.5 or 5 mM (used concentrations are specified in figures legends). Equivalent volumes of MeOH alone were used for control conditions, thus reaching 0.87%, 2.18% and 4.36% respectively.

Cell cultures

Human bronchial epithelial cell lines Calu-3-*CFTR*-WT and Calu-3 *CFTR*-KD, kindly provided by Dr. Marc Chanson [22] (University of Geneva, Geneva, CH), were cultured in 75 cm² flasks (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) in MEM-Glutamax (Invitrogen) medium supplemented with SVF 10% (Eurobio, Courtaboeuf, France), penicillin-streptomycin (100 U/mL, Invitrogen), sodium pyruvate 5% (Invitrogen), essential amino acids 1 mM (Invitrogen), and HEPES buffer 10 mM (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Calu-3 cells were then seeded in 12 (3-3.5x10⁵ cells/well) or 24 wells (2x10⁵ cells/well) wells-plates (TPP) and maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Non-CF and CF primary human bronchial epithelial cells (HBEC) (Epithelix, Plan-les-Ouates, Switzerland) (characteristics in **Table 3**) were grown on plastic supports (1x10⁵ cells/well) until confluent in hAEC culture medium supplemented with antibiotics (Epithelix).

SLC6A14 promoter activity

Gaussia luciferase (GLuc) reporters driven by the *SLC6A14* promoter harboring either the A or G allele of rs3788766 (GeneCopoeia, Rockville, MD, USA) were used. Calu-3-*CFTR*-KD cells were seeded in 24-well plates and transfected at 60% confluence with 1 μ g/ml of the GLuc *SLC6A14* promoter reporter using Lipofectamine 3000 (Invitrogen). After 24 h of transfection, culture media were collected, centrifuged 10 min at 10,000x g and supernatants were stored at -20°C. *SLC6A14* promoter activity was quantified by measuring Gaussia luciferase and secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) used as endogenous reporter, was measured using Secrete-Pair™ Dual Luminescence Assay kit (GeneCopoeia). *SLC6A14* promoter activity is represented as the ratio of GLuc normalized by SEAP.

L-Arginine uptake quantification

SLC6A14 amino acid transport was studied as described by others [23]. Briefly, cells cultured in 12-well plates were washed and then incubated in HEPES buffer (25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 5 mM Glucose, pH = 7.4) for 30 min at 37°C. Cells were then incubated with 300 μ l of HEPES buffer supplemented with 100 μ M Arginine and Arginine

Monohydrochloride L-[2,3,4-³H] (L-Arginine-2,3,4-³H, 1 μ Ci/mL, specific activity: 54.5 Ci/mmol, lot: 2422780, PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France) for 15 min and washed 3 times on ice with ice-cold HEPES with 10 mM Arginine (inhibition of uptake). Finally, cells were lysed with 400 μ l 0.5M NaOH for 15 min while shaking on ice. Radioactivity levels were measured in 300 μ l of sample in 7 mL of a scintillation liquid Ecolite Plus (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) and using Hidex 300SL (LabLogic ScienceTec, Villebon-sur-Yvette, France) equipment.

Wound-healing assay

Cell monolayers grown on plastic supports were injured mechanically (3 wounds per well) as previously described [24,25]. Afterwards, cells were washed with their culture medium to remove detached cells and treated with either α -MT (1, 2.5 or 5 mM) or MeOH which acted as vehicle control (respective equivalent volumes of MeOH alone). Photographs of the wounds were taken at two different positions on each wound using an inverted microscope with a X4 objective at t=0 h and t=6 h post-wounding. Images were analyzed with Image J software (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) to measure areas of the wounds at t=0 h and t=6 h and mean wound closure (% of the area at t=0 h) were calculated.

Cytotoxicity measurement

Toxicity of α -MT was verified using a commercially available assay (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, Madison, WI, USA).

Protein extraction and Western blot

Protein extracts (20 μ g) in RIPA buffer supplemented with antiprotease-antiphosphatase (Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail, Thermo Scientific) were reduced and size-separated on 4-15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and transferred onto nitrocellulose membranes using an iBlot2™ Gel Transfer Device and iBlot2™ Nitrocellulose Regular Stacks (IB23001, Invitrogen). Membranes were incubated with specific primary antibodies followed by corresponding secondary-HRP antibodies. Mouse anti- β -actin antibody (A2228) (1/1000) was from Sigma-Aldrich. Rabbit anti-phospho-mTOR (#2971, 1/1000), rabbit anti-mTOR (#2983, 1/1000), anti-mouse HRP (#7076, 1/10000) and anti-rabbit (#7074, (1/5000) antibodies were from Cell Signaling Technology (Denver, CO, USA). Immunodetection was revealed using Clarity™ Western ECL Substrate (#170-5061, Bio-Rad). Image acquisition was performed using Las-3000 (Fujifilm, Bussy-Saint-Georges, France). Densitometric quantification was performed using Image J software.

Statistical analysis

Genotype-phenotype analysis

Descriptive statistics are reported as mean \pm standard deviation (SD) or percentages. Association between lung disease severity and *SLC6A14* rs3788766 genotypes was evaluated by linear regression. We applied additive SNP coding, and the reference allele (i.e., the allele with the highest frequency in the European population) was taken from annotations of the human genome (<http://www.ensembl.org>). Fisher's exact test was used to test conformance of the allele frequencies with the Hardy-Weinberg equilibrium. A *P*-value of less than 5% was interpreted as evidence of a statistically significant association. Analyses were carried out using R software (version 3.6.3, <http://www.R-project.org/>).

In vitro data

All data are presented as mean \pm SEM and the number of repeated experiments is indicated in the figure legends. GraphPad Prism version 7.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used to analyze all data. Paired or unpaired t-tests were used to compare two groups. One-way ANOVA were used for comparison of more than two groups and followed by appropriate post-hoc tests as indicated in the figure's legends. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant. In figures, statistical differences are indicated as $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) or non-significant (NS).

RESULTS

***SLC6A14* SNP rs3788766 is associated with lung function in people with CF**

Among the 4,975 pwCF included in the French CF modifier gene study (i.e. 70% of French pwCF) and after application of the exclusion criteria, 3,257 pwCF were analyzed in the genotype/phenotype association study. Demographic characteristics of the participants are summarized in **Table 1**. The minor allele frequency (MAF) of *SLC6A14* SNP rs3788766 in our cohort was 0.38, similar to that reported in Europeans (0.36). As *SLC6A14* is located on the X chromosome, Hardy-Weinberg equilibrium *p*-value was computed by Fisher's exact test among females. Results showed that our cohort does not significantly diverge from Hardy-Weinberg equilibrium (p -value=0.459). We also found that *SLC6A14* SNP rs3788766 was associated with lung function with the G allele being deleterious. Linear regression models estimated that pwCF carriers of the minor allele G had a significant increase in lung disease severity, which was measured by an average loss in SaKnorm Z-value of 0.038 ± 0.016 for each G allele ($p=0.020$) (**Table 2**). Overall, an average decrease of $\sim 1.5\%$ of ppFEV₁ was observed in patients carrying at least one rs3788766 G allele (**Table 2**).

***SLC6A14* rs3788766 genotype affects *SLC6A14* promoter activity**

The *SLC6A14* SNP rs3788766, located within *SLC6A14* promoter (**Fig. 1A**), is likely to affect *SLC6A14* mRNA expression. Quantitative-trait Loci (QTL) expression data extracted from GTEx (<https://www.gtexportal.org/home/>) show that rs3788766 G is associated with a decrease of *SLC6A14* transcript expression in different tissues (**Fig. 1B**), including the pituitary (p-value = 3.0×10^{-8}) and the minor salivary gland (p-value = 1.8×10^{-5}). In the lung, a diminished but not statistically significant expression is observed (AA vs GG genotypes). It is worth mentioning that, for the GTEx project, the preferred location for the lung tissue collection is in the inferior segment of the left upper lobe, 1 cm below the pleural surface, avoiding any large arteries, veins, and bronchi. We observed by immunohistochemistry that *SLC6A14* is predominantly expressed in the bronchial epithelium of pwCF (**Fig. 1C**). Therefore, *SLC6A14* expression using QTL analysis might not inform about SNP consequences on *SLC6A14* expression in the lung. Thus, to determine whether rs3788766 affects *SLC6A14* promoter activity in bronchial epithelial cells, we used *SLC6A14* promoter reporters carrying either the A or the G allele of this SNP and assessed the reporters expression. We observed that Calu-3-*CFTR*-KD cells transfected with *SLC6A14* promoter reporter plasmid carrying the G allele had a lower luciferase activity (12.1% reduction) compared to cells transfected with the A allele (**Fig. 1D**). This result indicates that the G allele of rs3788766, i.e. the minor allele, is associated with a decreased *SLC6A14* promoter activity.

***SLC6A14* inhibition in human bronchial epithelial cells regulate mTOR phosphorylation and epithelial repair**

Since the *SLC6A14* rs3788766 G allele is likely to reduce *SLC6A14* mRNA expression level and consequently its activity as an amino acid transporter, we sought to investigate the cellular consequences of a decreased activity of *SLC6A14* in CF bronchial epithelial cells. Thus, we inhibited its activity in bronchial epithelial cells using α -MT, a specific pharmacological blocker of *SLC6A14* [26]. Firstly, we showed that α -MT induced a 54%-decrease of ^3H -Arginine transport in Calu-3-*CFTR*-KD cells (**Fig. 2A**). A similar effect was observed in Calu-3-*CFTR*-WT (**Fig. S2A**). We then measured LDH release to ensure that α -MT was not toxic at the doses used (**Fig. S1**). We showed that cytotoxicity levels in Calu-3-*CFTR*-KD treated with 1mM, 2.5mM and 5mM of α -MT were similar to those of cells treated with vehicle (**Fig. S1A**). As *SLC6A14* is involved in colon cancer cell proliferation, migration and invasion [27], we wondered whether it could play a role in bronchial epithelial repair, a process which involves both cell proliferation and migration mechanisms. Thus, we performed scratch assay experiments on Calu-3-*CFTR*-KD monolayers, treated or without α MT at t=0 h and for the following 6 h of repair (**Fig. 2B** and **C**). Quantitative analysis highlighted a dose-dependent inhibition of wound closure with decreases of 8%, 27% and 39%, at 1mM, 2.5mM and 5mM of α -MT, respectively (**Fig. 2B**). In contrast,

no significant wound closure inhibition was observed at 1mM and 2.5mM of α -MT in Calu-3-*CFTR*-WT, but a 31% decrease of wound closure was observed at 5mM of α -MT (**Fig. S2B**). To determine that this effect was not restricted to the Calu-3 cell lines, we performed similar experiments in primary HBECs isolated from patient with CF homozygous for the F508del *CFTR* variant (**Fig. 3**) or from healthy subjects (**Fig. S3**). Significant decreases of 25% and 36% of arginine transport were observed in CF HBECs treated with 2.5mM and 5mM of α -MT, respectively (**Fig. 3A**). Similar to the Calu-3 cells, no increase in cytotoxicity has been observed in non-CF HBECs treated or not with α -MT (**Fig. S1B**). A decrease of 32% and 56% of wound closure after 6 h of repair was observed in CF HBECs with 2.5mM and 5mM of α -MT (**Fig. 3B**), respectively, while 26% and 79% decreases were found in non-CF HBECs with 2.5mM and 5mM of α -MT (**Fig. S3A**), respectively. Finally, we wondered if SLC6A14 amino acid transport inhibition could have an impact on mTOR activity in primary bronchial epithelial cells, as it was previously shown in pancreatic and colonic cells [14,27]. Therefore, we evaluated mTOR activation by western blot in primary HBECs treated or not with 2.5mM of α -MT. From results generated, we observed that SLC6A14 activity inhibition induces a significant decrease of mTOR phosphorylation in primary CF (**Fig. 3C**) cells. A similar effect is observed in non-CF (**Fig. S3B**) HBECs, however without reaching significance.

DISCUSSION

Lung disease severity is highly variable among pwCF, with *CFTR*, the environment and modifier genes all contributing to this variability. Among the modifier genes, *SLC6A14* is of particular interest because it has been associated with both lung and digestive phenotypes in pwCF [9,16-18]. This suggests a major pleiotropic role of SLC6A14 in the overall pathophysiology of the disease [13]. Here, we confirmed the association between *SLC6A14* SNP rs3788766 and the lung function of pwCF, and further demonstrated that carrying the minor allele of rs3788766 induces a decreased *SLC6A14* promoter activity. We finally demonstrated that a reduced SLC6A14 amino acid transport activity alters wound repair mechanisms and modulates the mTOR pathway in human CF bronchial epithelial cells.

Our study first showed, using a large French CF cohort (n=3,257), that pwCF carrying at least one minor allele G of the *SLC6A14* SNP rs3788766 exhibit reduced lung function compared to those carrying two major allele A, confirming prior studies [16,17]. Li *et al.* performed a sub-analysis from the original 1,661 Canadian CF Gene Modifier Study participants of a previous study [18] and showed that rs3788766 is associated with both pediatric lung disease severity and earlier age at first acquisition of *P. aeruginosa* [16]. Other *SLC6A14* SNPs, also associated with lung function of pwCF, have been identified either by GWAS [9] or genotyping [13]. Beside lung phenotype, Sun *et al.* showed that the SNP rs3788766 is associated with digestive manifestations of CF, such as increased MI susceptibility in a cohort of 3,763 pwCF [15]. Those results were further confirmed in a genome-wide association

investigation performed by the International CF Gene Modifier Consortium with 6,770 pwCF [28]. Altogether, these results emphasize the major involvement of this particular SNP of *SLC6A14* in CF clinical variability.

To understand how this SNP can contribute to CF pathophysiology and because of its location within *SLC6A14* regulatory region, we evaluated its impact on *SLC6A14* promoter activity. We found that the minor allele G, previously identified as the deleterious allele regarding CF patient's lung function, is associated with a decrease of *SLC6A14* promoter activity in bronchial epithelial cells. This is in contradiction with eQTL data in GTEX lung samples. However, as evocated above, this discrepancy likely results from GTEX lung samples collection avoiding bronchi. In addition, *SLC6A14* eQTLs were already shown not to colocalize with lung GWAS associated evidence [28]. This is the first report showing that a *SLC6A14* SNP might influence *SLC6A14* transcription in the context of CF. Indeed, *SLC6A14* expression and function have been mostly investigated in cancers so far [29]. It is worth mentioning that, using a similar method, a recent report has shown that the obesity-associated *SLC6A14* SNP rs2011162 also reduced *SLC6A14* expression [30].

Recently, some studies have explored the role of *SLC6A14* in CF pathophysiology and began to explain the reasons for its identification as a modifier gene of CF lung and intestinal diseases. Di Paola *et al.* showed that the inhibition of *SLC6A14* amino acid transport increased *P. aeruginosa* attachment to human bronchial epithelial cells by enhancing L-arginine levels in the airway surface liquid [23]. Arginine transport through *SLC6A14* also seems to increase F508del-CFTR protein by enhancing nitric oxide (NO) production and activating cGMP or PKG pathways [31]. NO production increase has also been suggested to contribute to anti-infectious response because it is well-known to have bactericidal effects on *P. aeruginosa* [32]. Thus, *SLC6A14* seems to modulate CFTR activity and could participate in the infectious process of CF airways by *P. aeruginosa*. Concerning the role of *SLC6A14* in the intestine, it has been suggested that *SLC6A14* involvement in MI susceptibility could be related to intestinal fluid secretion defect in CF, which was worsened in *Slc6a14*-KO CF mice carrying the major mutation F508del [33].

Here, we report, for the first time, that *SLC6A14* is involved in bronchial epithelial repair. In healthy epithelia, repair processes involving cell proliferation, migration and differentiation, facilitate epithelial integrity restoration and function. In CF, repair mechanisms are altered and chronic infections with various pathogens and exacerbated inflammation induce progressive epithelial damage [34]. Our results demonstrated that, in Calu-3 cells and primary HBEC, pharmacological inhibition of *SLC6A14* activity resulted in a delayed epithelial repair. *SLC6A14* involvement in cell migration and proliferation has been previously described. Indeed, Sikder *et al.* first showed that *SLC6A14* function favors cell proliferation and invasion in colon cancer LS174T cell line [27]. In addition, Mao *et al.* showed that *SLC6A14* overexpression or knockdown respectively promotes or inhibits migration and proliferation

of colorectal cancer cells (HCT-116 and Caco-2 cells) *in vitro* [35]. They also found that the pharmacological inhibitor α -MT inhibited cell proliferation as well as the fact that SLC6A14 promoted colorectal cancer cell proliferation and migration via the JAK2/STAT3 pathway. SLC6A14 involvement in cell proliferation has also been shown in other cancer cells such as pancreatic cancer cells [14].

In addition to its role in epithelial repair, we highlighted that it may be involved in the mTOR pathway. The mTOR pathway balances anabolism and catabolism in order to control key cellular processes such as cell growth or proliferation. It is very sensitive to amino acids starvation especially leucine and arginine [36]. SLC6A14 implication in mTOR pathway was previously described in pancreatic cancer cell lines [14] for which α -MT-mediated SLC6A14 blockade induces the decreased phosphorylation of proteins involved in mTOR pathway including 4E-BP1, eIF-2 α and S6kinase. This interplay between SLC6A14 and mTOR was also recently confirmed in colon cancer LS174T cell line treated with α -MT [27]. In intestinal epithelium, mTOR is involved in wound healing and the re-establishment of barrier function following injury [37]. Consistent with the literature, we confirmed the relation between SLC6A14 activity and mTOR activation. However, how airway epithelial repair, mTOR and SLC6A14 are related remains unknown. Recently, SLC6A14 was shown to be a target for Wnt-signaling [27], which is known to be one of the key pathways involved in lung repair and regeneration in response to injury [38]. Further work is thus necessary to fully understand the consequences of SLC6A14 blockade on the molecules of the mTOR pathway specifically related to this wound repair process.

To conclude, we confirmed that *SLC6A14* rs3788766 genotype influences the lung disease severity of pwCF. This study also showed that *SLC6A14* might influence CF lung phenotype *via* mTOR signaling pathway and epithelial repair processes modulation.

Acknowledgements

We would like to thank the patients, care providers and clinic coordinators at CF Centres, as well as the Principal Investigators in the several contributing French CF Centres:

M. ABELY, American Memorial Hospital, Reims / C. BAILLY PICCINI, CHU de Nice, Nice / C. BELLEGUIC, Hôpital Pontchaillou, Rennes / K. BESSACI, American Memorial Hospital, Reims / T. BIHOUEE, Hôpital Mère-Enfant, Nantes / Y. BILLON, Hôpital de Brabois, Vandoeuvre les Nancy / F. BRÉMONT, Hôpital des Enfants de Toulouse, Toulouse / J. BROUARD, Centre Hospitalier Universitaire de Caen, Caen / S. BUI, Hôpital Des Enfants Groupe Pellegrin, Bordeaux / P.R. BURGEL, Hôpital Cochin, Paris / B. CAMARA, Hôpital de la Tronche, Grenoble / M.C. HERAUD, Centre Hospitalier Estaing, Clermont-Ferrand / R. CHIRON, Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier / E. COIRIER-DUET, Hôpital André Mignot, Le Chesnay / L. COSSON, Hôpital Clocheville, Tours / M.L. DALPHIN, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, Besançon / I. DANNER BOUCHER, Centre

Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes / V. DAVID, Hôpital Mère-Enfant, Nantes / E. DENEUVILLE, Hôpital Sud Annexe Pédiatrique, Rennes / P. DOMBLIDES, Hôpital Haut Lévêque, Pessac / S. DOMINIQUE, Centre Hospitalier Universitaire Charles Nicolle, Rouen / J.C. DUBUS, Hôpital d'Enfants de la Timone, Marseille / N. DUFEU, Hôpital Nord, Marseille / I. DURIEU, UCBL1, Groupe Hospitalier Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, Pierre Bénite / S. DURY, Hôpital Maison Blanche, Reims / R. EPAUD, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Créteil / FANTON, A., Hôpital d'Enfants du Bocage, Dijon / M. FAYON, Hôpital Des Enfants Groupe Pellegrin, Bordeaux / P. FOUCAUD, Hôpital André Mignot, Le Chesnay / M. GERARDIN, Hôpital Robert Debré, Paris / J.L. GINIES, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers / D. GRENET, Hôpital Foch, Suresnes / D. HUBERT, Hôpital Cochin, Paris / F. HUET, Hôpital d'Enfants du Bocage, Dijon / R. KESSLER, Hôpital Civil, Strasbourg / J. LANGUEPIN, Centre Hospitalier, Limoges / M. LAURENS, Centre Hospitalier Universitaire de Caen, Caen / M. LE BOURGEOIS, Necker Hôpital d'Enfants Malades, Paris / P. LE ROUX, Hôpital Jacques Monod, Montvilliers / S. LEROY, CHU de Nice, Nice / C. LLERENA, Hôpital de la Tronche, Grenoble / J. MACEY, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux / J. MANKIKIAN, Hôpital Clocheville, Tours / C. MARGUET, Centre Hospitalier Universitaire Charles Nicolle, Rouen / L. MELY, Hôpital Renée Sabran, Giens / M. MITTAINÉ, Hôpital des Enfants de Toulouse, Toulouse / A. MUNCK, Hôpital Robert Debré, Paris / M. MURRIS-ESPIN, Hôpital Larrey, Toulouse / R. NOVE JOSSERAND, Groupe Hospitalier Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, Pierre Bénite / C. PERISSON, Groupe Hospitalier Sud Réunion, Saint-Pierre de la Réunion / I. PIN, Hôpital de la Tronche, Grenoble / A. PREVOTAT, Hôpital Calmette, Lille / S. RAMEL, Centre de Perharidy, Roscoff / C. RAMES, Hôpital Nord, Amiens / G. RAULT, Centre de Perharidy, Roscoff / P. REIX, Hôpital Femme Mère Enfant, Bron / N. REMUS, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Créteil / M. REYNAUD-GAUBERT, Hôpital Nord, Marseille / B. RICHAUD-THIRIEZ, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, Besançon / J.L. RITTIE, Hôpital d'Enfants, Saint-Denis de la Réunion / M. SCALBERT-DUJARDIN, Centre Hospitalier de Dunkerque, Dunkerque / I. SERMET-GAUDELUS, Necker Hôpital d'Enfants Malades, Paris / N. STREMLER, Hôpital d'Enfants de la Timone, Marseille / V. STORNI, Centre Hospitalier Bretagne Atlantique, Vannes / A. TATOPOULOS, Hôpital d'Enfants, Vandoeuvre les Nancy / F. TROUSSIER, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers / P. VIGNERON, Centre Hospitalier Bretagne Sud, Lorient / L. WEISS, Hôpital de Haute-pierre, Strasbourg / N. WIZLA, Hôpital Jeanne de Flandre, Lille / K. CAMPBELL, Centre Hospitalier Universitaire de Caen, Caen.

Authors contributions: All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Julia Mercier, Manon Ruffin, Erika Sutanto, Anthony Kicic, Claire Calmel, Julie Mésinèle, Fathia Merabtene, Elisabeth Longchamp, Edouard Sage.

The first draft of the manuscript was written by Julia Mercier and all authors commented on following versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Running title: SLC6A14 in cystic fibrosis lung pathophysiology

Funding: JM received a doctoral fellowship from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. MR received a post-doctoral fellowship from the French cystic-fibrosis non-profit organization *Vaincre la mucoviscidose* (RF20180502243, RF20190502451). LG received a grant from the French cystic-fibrosis non-profit organization *Vaincre la mucoviscidose* (RF20170501936, RF20180502243, RF20190502451).

REFERENCES

1. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK *et al.* (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245 (4922):1073-1080. doi:10.1126/science.2570460
2. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R *et al.* (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245 (4922):1066-1073. doi:10.1126/science.2475911
3. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G *et al.* (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245 (4922):1059-1065. doi:10.1126/science.2772657
4. Dupuis A, Keenan K, Ooi CY, Dorfman R, Sontag MK *et al.* (2016) Prevalence of meconium ileus marks the severity of mutations of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 18 (4):333-340. doi:10.1038/gim.2015.79
5. Macdonald JA, Trusler GA (1960) Meconium ileus: an eleven-year review at the Hospital for Sick Children, Toronto. *Canadian Medical Association journal* 83 (17):881-885
6. Parikh NS, Ibrahim S, Ahlawat R (2021) Meconium Ileus. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL),
7. Elborn JS (2016) Cystic fibrosis. *Lancet* 388 (10059):2519-2531. doi:10.1016/S0140-6736(16)00576-6
8. Cutting GR (2015) Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 16 (1):45-56. doi:10.1038/nrg3849

9. Corvol H, Blackman SM, Boelle PY, Gallins PJ, Pace RG *et al.* (2015) Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nat Commun* 6:8382. doi:10.1038/ncomms9382
10. Jain-Vakkalagadda B, Pal D, Gunda S, Nashed Y, Ganapathy V *et al.* (2004) Identification of a Na⁺-dependent cationic and neutral amino acid transporter, B^(0,+), in human and rabbit cornea. *Mol Pharm* 1 (5):338-346
11. Palazzolo L, Paravicini C, Laurenzi T, Adobati S, Saporiti S *et al.* (2019) SLC6A14, a Pivotal Actor on Cancer Stage: When Function Meets Structure. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D* 24 (9):928-938. doi:10.1177/2472555219867317
12. Sloan JL, Mager S (1999) Cloning and functional expression of a human Na⁽⁺⁾ and Cl⁽⁻⁾-dependent neutral and cationic amino acid transporter B⁽⁰⁺⁾. *J Biol Chem* 274 (34):23740-23745. doi:10.1074/jbc.274.34.23740
13. Ruffin M, Mercier J, Calmel C, Mesinele J, Bigot J *et al.* (2020) Update on SLC6A14 in lung and gastrointestinal physiology and physiopathology: focus on cystic fibrosis. *Cell Mol Life Sci* 77 (17):3311-3323. doi:10.1007/s00018-020-03487-x
14. Coothankandaswamy V, Cao S, Xu Y, Prasad PD, Singh PK *et al.* (2016) Amino acid transporter SLC6A14 is a novel and effective drug target for pancreatic cancer. *Br J Pharmacol* 173 (23):3292-3306. doi:10.1111/bph.13616
15. Sun L, Rommens JM, Corvol H, Li W, Li X *et al.* (2012) Multiple apical plasma membrane constituents are associated with susceptibility to meconium ileus in individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet* 44 (5):562-569. doi:10.1038/ng.2221
16. Li W, Soave D, Miller MR, Keenan K, Lin F *et al.* (2014) Unraveling the complex genetic model for cystic fibrosis: pleiotropic effects of modifier genes on early cystic fibrosis-related morbidities. *Hum Genet* 133 (2):151-161. doi:10.1007/s00439-013-1363-7
17. Pereira SV, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Marson FAL (2017) Association of clinical severity of cystic fibrosis with variants in the SLC gene family (SLC6A14, SLC26A9, SLC11A1 and SLC9A3). *Gene* 629:117-126. doi:10.1016/j.gene.2017.07.068
18. Sun L, Rommens JM, Corvol H, Li W, Li X *et al.* (2012) Multiple apical plasma membrane constituents are associated with susceptibility to meconium ileus in individuals with cystic fibrosis. *44* (5):562-569. doi:10.1038/ng.2221
19. Castellani C, Duff AJA, Bell SC, Heijerman HGM, Munck A *et al.* (2018) ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J Cyst Fibros* 17 (2):153-178. doi:10.1016/j.jcf.2018.02.006
20. Quanjer PH, Stanojevic S, Cole TJ, Baur X, Hall GL *et al.* (2012) Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3-95-yr age range: the global lung function 2012 equations. *Eur Respir J* 40 (6):1324-1343. doi:10.1183/09031936.00080312
21. Kulich M, Rosenfeld M, Campbell J, Kronmal R, Gibson RL *et al.* (2005) Disease-specific reference equations for lung function in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 172 (7):885-891. doi:10.1164/rccm.200410-1335OC

22. Bellec J, Bacchetta M, Losa D, Anegon I, Chanson M *et al.* (2015) CFTR inactivation by lentiviral vector-mediated RNA interference and CRISPR-Cas9 genome editing in human airway epithelial cells. *Curr Gene Ther* 15 (5):447-459
23. Di Paola M, Park AJ, Ahmadi S, Roach EJ, Wu YS *et al.* (2017) SLC6A14 Is a Genetic Modifier of Cystic Fibrosis That Regulates *Pseudomonas aeruginosa* Attachment to Human Bronchial Epithelial Cells. *MBio* 8 (6). doi:10.1128/mBio.02073-17
24. Ruffin M, Bilodeau C, Maillé É, LaFayette SL, McKay GA *et al.* (2016) Quorum-sensing inhibition abrogates the deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* on airway epithelial repair. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30 (9):3011-3025. doi:10.1096/fj.201500166R
25. Valera FCP, Ruffin M, Adam D, Maillé É, Ibrahim B *et al.* (2019) Staphylococcus aureus impairs sinonasal epithelial repair: Effects in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and control subjects. *The Journal of allergy and clinical immunology* 143 (2):591-603.e593. doi:10.1016/j.jaci.2018.05.035
26. Karunakaran S, Umapathy NS, Thangaraju M, Hatanaka T, Itagaki S *et al.* (2008) Interaction of tryptophan derivatives with SLC6A14 (ATB⁰⁺) reveals the potential of the transporter as a drug target for cancer chemotherapy. *Biochem J* 414 (3):343-355. doi:10.1042/BJ20080622
27. Sikder MOF, Sivaprakasam S, Brown TP, Thangaraju M, Bhutia YD *et al.* (2020) SLC6A14, a Na⁺/Cl⁻-coupled amino acid transporter, functions as a tumor promoter in colon and is a target for Wnt signaling. *Biochem J* 477 (8):1409-1425. doi:10.1042/BCJ20200099
28. Gong J, Wang F, Xiao B, Panjwani N, Lin F *et al.* (2019) Genetic association and transcriptome integration identify contributing genes and tissues at cystic fibrosis modifier loci. *PLoS Genet* 15 (2):e1008007. doi:10.1371/journal.pgen.1008007
29. Sikder MOF, Yang S, Ganapathy V, Bhutia YD (2017) The Na⁽⁺⁾/Cl⁽⁻⁾-Coupled, Broad-Specific, Amino Acid Transporter SLC6A14 (ATB⁽⁰⁺⁾): Emerging Roles in Multiple Diseases and Therapeutic Potential for Treatment and Diagnosis. *AAPS J* 20 (1):12. doi:10.1208/s12248-017-0164-7
30. Sivaprakasam S, Sikder MOF, Ramalingam L, Kaur G, Dufour JM *et al.* (2021) SLC6A14 deficiency is linked to obesity, fatty liver, and metabolic syndrome but only under conditions of a high-fat diet. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1867 (5):166087. doi:10.1016/j.bbadis.2021.166087
31. Ahmadi S, Wu YS, Li M, Ip W, Lloyd-Kuzik A *et al.* (2019) Augmentation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function in Human Bronchial Epithelial Cells via SLC6A14-Dependent Amino Acid Uptake. Implications for Treatment of Cystic Fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 61 (6):755-764. doi:10.1165/rcmb.2019-0094OC
32. Hibbard HAJ, Reynolds MM (2019) Fluorescent nitric oxide donor for the detection and killing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of materials chemistry B* 7 (12):2009-2018. doi:10.1039/c8tb02552e

33. Ahmadi S, Xia S, Wu YS, Di Paola M, Kissoon R *et al.* (2018) SLC6A14, an amino acid transporter, modifies the primary CF defect in fluid secretion. *Elife* 7. doi:10.7554/eLife.37963
34. Ruffin M, Brochiero E (2019) Repair Process Impairment by *Pseudomonas aeruginosa* in Epithelial Tissues: Major Features and Potential Therapeutic Avenues. *Front Cell Infect Microbiol* 9:182. doi:10.3389/fcimb.2019.00182
35. Mao H, Sheng J, Jia J, Wang C, Zhang S *et al.* (2021) Aberrant SLC6A14 Expression Promotes Proliferation and Metastasis of Colorectal Cancer via Enhancing the JAK2/STAT3 Pathway. *Onco Targets Ther* 14:379-392. doi:10.2147/OTT.S288709
36. Liu GY, Sabatini DM (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21 (4):183-203. doi:10.1038/s41580-019-0199-y
37. Kaur H, Moreau R (2019) Role of mTORC1 in intestinal epithelial repair and tumorigenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 76 (13):2525-2546. doi:10.1007/s00018-019-03085-6
38. Raslan AA, Yoon JK (2020) WNT Signaling in Lung Repair and Regeneration. *Molecules and cells* 43 (9):774-783. doi:10.14348/molcells.2020.0059

Table 1. Demographic and clinical characteristics of 3,257 patients with cystic fibrosis analyzed in the phenotype-genotype study

Characteristics	Patients analyzed in <i>SLC6A14</i> rs3788766 study
Age at inclusion (years), mean ± SD	21.5 ± 8.4
Females, % (n)	49% (1581)
Caucasian origin, % (n)	91% (2976)
Lung transplant, % (n)	17% (567)
CFTR modulator therapy [#] , % (n)	29% (935)
<i>CFTR</i> genotypes, % (n)	
F508del homozygous	54% (1750)
F508del heterozygous	35% (1154)
Others	11% (353)

[#]Patients who have started CFTR modulator therapy with ivacaftor or lumacaftor-ivacaftor. *CFTR*: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Table 2. Genotype-phenotype association study between lung disease severity and *SLC6A14* rs3788766 genotypes, in 3,257 patients with cystic fibrosis

<i>SLC6A14</i> rs3788766 genotypes	Patients analyzed % (n)	Lung function ppFEV ₁ [#] mean ± SD	Lung disease severity SaKnorm Z-value ^{##} mean ± SD	<i>P</i> -value [†]
AA	50% (1624)	64.9 ± 27.2	0.360 ± 0.795	
AG	23% (740)	63.5 ± 25.7	0.302 ± 0.797	0.020
GG	27% (893)	63.1 ± 26.4	0.287 ± 0.780	

[#]ppFEV₁: Percent-predicted (pp) Forced expiratory volume in one second (FEV₁). SaKnorm: Survival adjusted Kulich Normalized. [†]*P*-value was computed by linear regression with additive model.

Table 3. Characteristics of the patients from whom the primary bronchial epithelial cells were obtained.

Patient	Age	Sex	Smoker	Pathology	<i>CFTR</i> variant	Figure
CFAB060901	21	Female	No	CF	F508del/F508del	3A, 3B, 3C
CFAB056701	39	Female	No	CF	F508del/F508del	3C
CFAB45202	32	Male	No	CF	F508del/F508del	3B
CFAB064901	37	Female	No	CF	F508del/1717-1G>A	3C
02AB77201F2	63	Male	No	None	-	S3A
02AB067101	72	Male	No	None	-	S3B
02AB068001F2	71	Female	No	None	-	S3B
02AB083901	59	Male	No	None	-	S3B

FIGURES

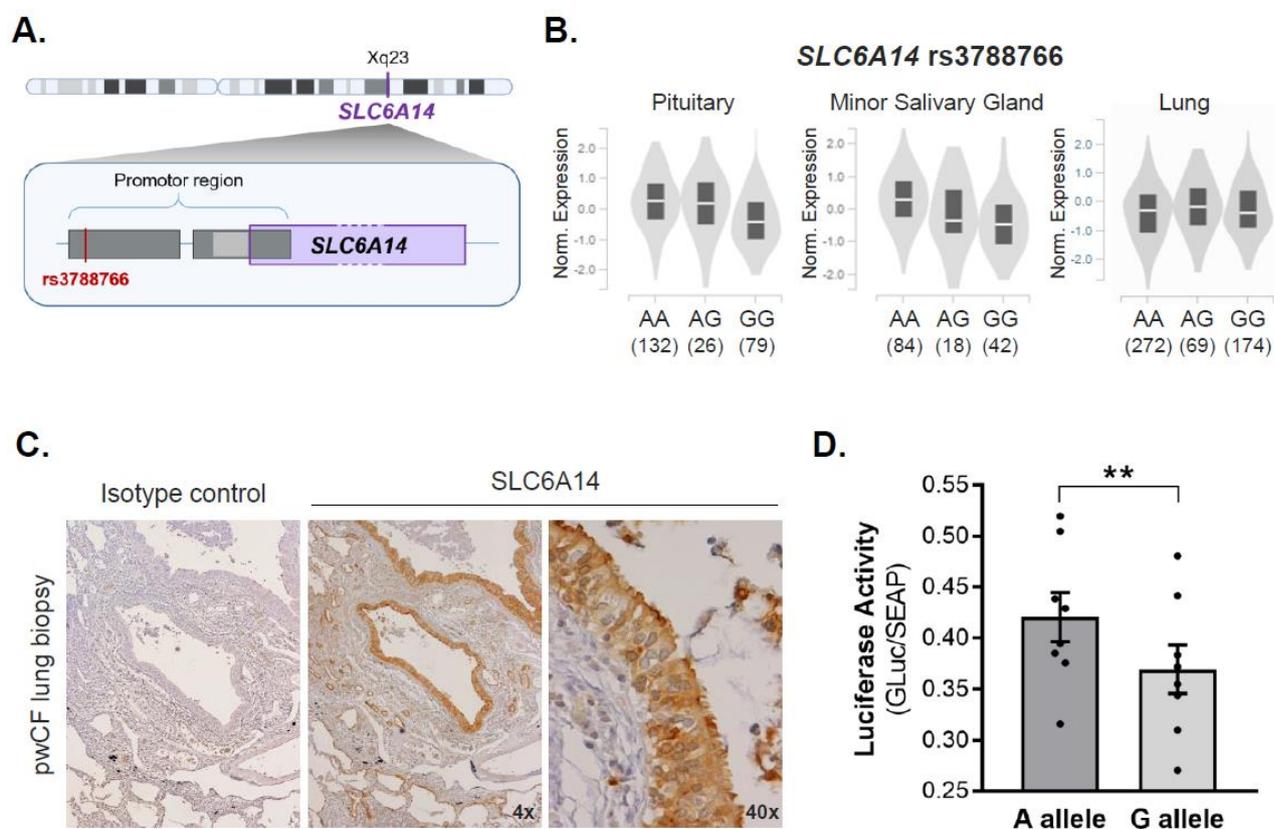


Figure 1. *SLC6A14* rs3788766 variant is associated with gene transcription regulation. A. Graphical representation of the localization of rs3788766 and *SLC6A14* gene on X chromosome. B. Violin plots of *SLC6A14* transcript expression in tissues according to rs3788766 genotypes in Genotype-Tissue Expression (GTEx, <https://www.gtexportal.org/home/>). C. Representative images of *SLC6A14* immunohistochemistry on pwCF lung biopsy. D. *SLC6A14* promoter activity measurement was performed on Calu-3-*CFTR*-KD transfected with the reporter plasmid constructs containing A allele or G allele of rs3788766 (n=8) (Wilcoxon test, **p<0.01).

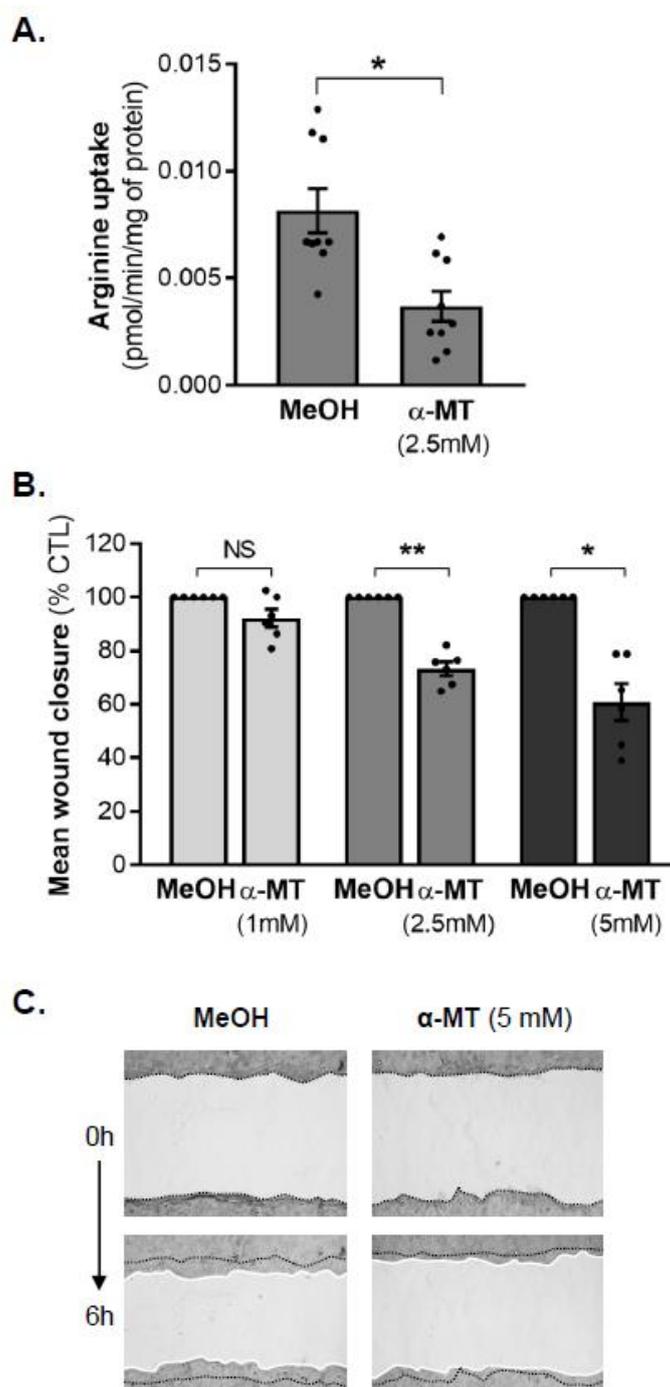


Figure 2. Effect of SLC6A14 inhibition in Calu-3-CFTR-KD cells. **A.** ^3H -Arginine uptake in Calu-3-CFTR-KD cells treated with α -MT (2.5mM) or vehicle (MeOH) (n=9, Wilcoxon test, *p<0.05). **B.** Calu-3-CFTR-KD were treated with increasing doses of α -MT or vehicle (MeOH) for 6 h. Quantification of wound closure expressed in mean % compared to the control condition (n=6, ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test, * p<0.05, ** p<0.01). **C.** Representative images of wounds at 0h and 6h in control (MeOH) and α -MT conditions. Wounds have been brightened on the pictures and white lines have been drawn at the wound edges for a better visualization.

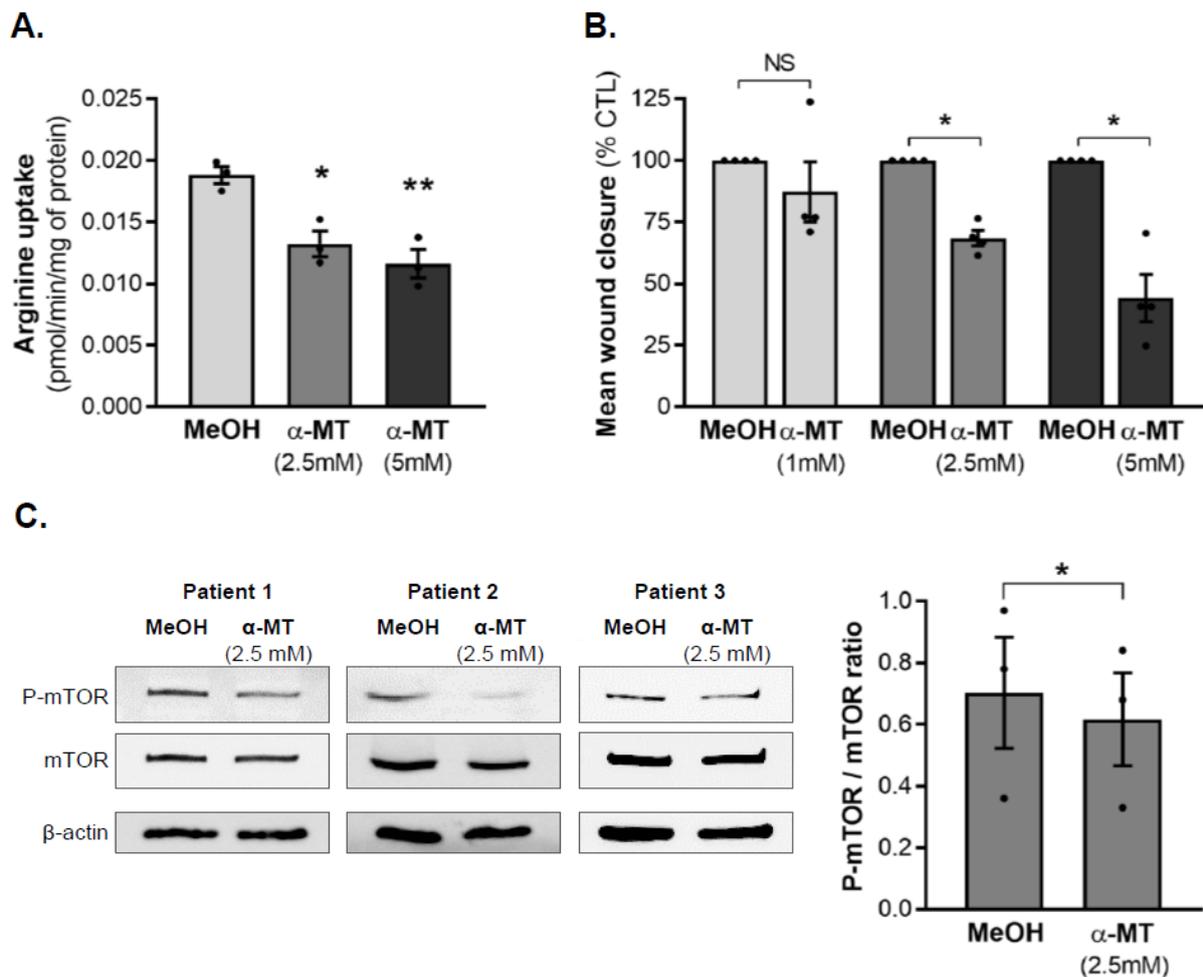


Figure 3. Effect of SLC6A14 inhibition in CF primary human bronchial epithelial cells (HBEC). **A.** ^3H -arginine uptake in CF primary HBEC treated or not with α -MT (n=3, ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test, * p<0.05, ** p<0.01). **B.** Measurement of epithelial repair (6 h) of CF primary HBEC treated with increasing doses of α -MT or vehicle (MeOH). Quantification of wound closure is expressed in mean % compared to the control condition (n=4, ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test, * p<0.05). **C.** Western blot, images of phospho-mTOR, total mTOR and β -actin (loading control) (**left**) and quantification of P-mTOR / mTOR ratio (**right**) in CF primary HBEC treated 6 h with 2.5 mM α -MT or control vehicle (MeOH). Test * p<0.05.

SUPPLEMENTARY DATA

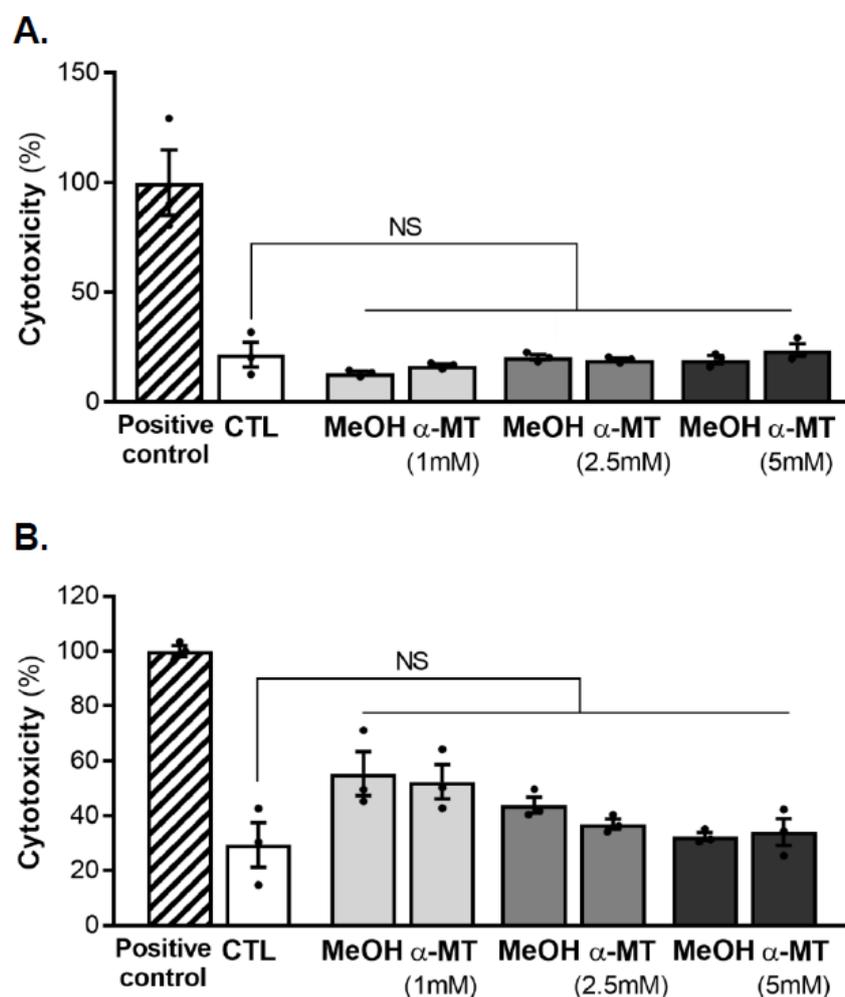


Figure S1. Impact of α -MT on cell viability. **A.** Cell viability of Calu-3-*CFTR*-KD cells treated with increasing doses of α -MT or vehicle (MeOH) ($n=3$, ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). **B.** Impact of α -MT on viability of non-CF primary human bronchial epithelial cells ($n=3$, ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test).

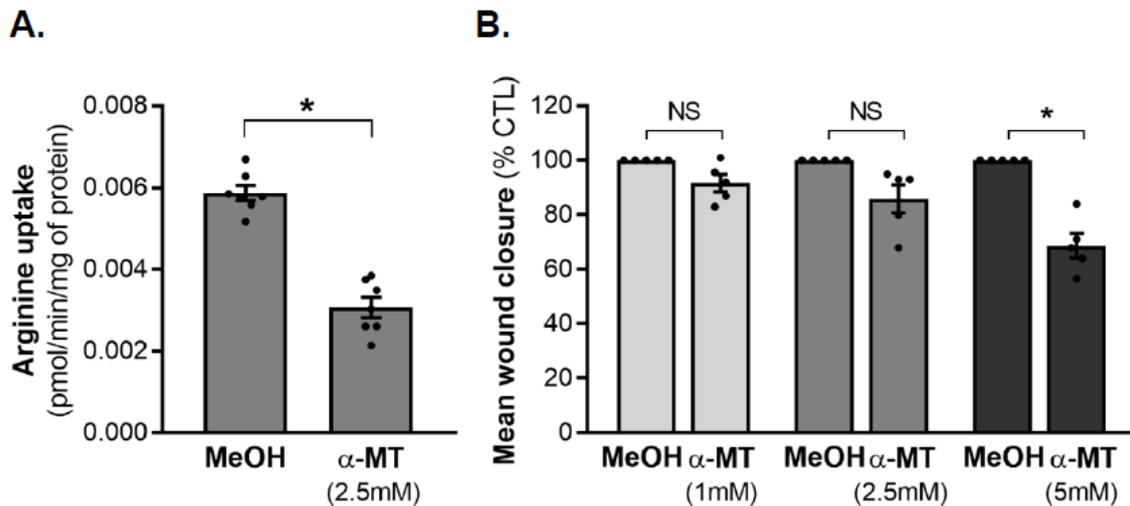


Figure S2. Effect of SLC6A14 inhibition in Calu-3-CFTR-WT cells. A. ^3H -Arginine uptake in Calu-3-CFTR-WT cells treated with α -MT (2.5 mM) or vehicle (MeOH) (n=7, Wilcoxon test, * p<0.05). **B.** Epithelial repair of Calu-3-CFTR-WT cells treated with increasing doses of α -MT or vehicle (MeOH). Quantification of wound closure is expressed in mean % compared to the control condition (n=5, ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test, * p<0.05).

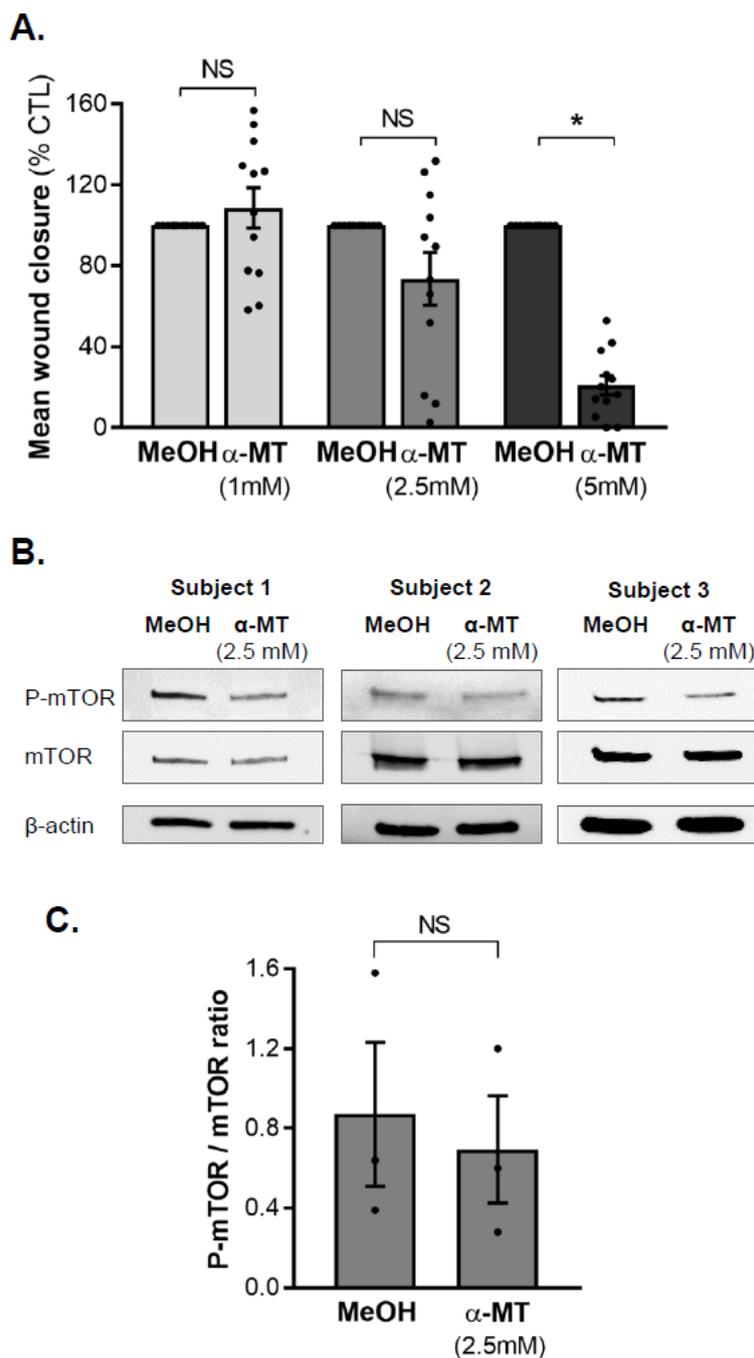


Figure S3. Impact of SLC6A14 inhibition in non-CF primary human bronchial epithelial cells. **A.** Epithelial repair of non-CF primary human bronchial epithelial cells. Quantification of wound closure is expressed in mean % compared to the control condition (n=12, ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test, *p<0.05). **B.** Western blot of phospho-mTOR, total mTOR and β -actin (loading control) of primary HBEC from three non-CF subjects, treated 6 h with 2.5 mM α -MT or control vehicle (MeOH). **C.** Quantification of P-mTOR / mTOR ratio in primary HBEC from three non-CF subjects, treated 6 h with 2.5 mM α -MT or control vehicle (MeOH).

II- Etude de la modulation de l'expression et de la fonction de la protéine SLC6A14 en contexte inflammatoire et infectieux de la mucoviscidose

a. Résumé

La mucoviscidose est caractérisée par des cycles chroniques d'infection et d'inflammation, responsables d'une altération de l'épithélium des voies respiratoires et d'un déclin de la fonction pulmonaire. *P. aeruginosa*, le principal agent pathogène présent dans les poumons des patients adultes, est particulièrement responsable de l'aggravation de l'atteinte pulmonaire. *SLC6A14*, un gène codant pour un transporteur d'acides aminés, agit comme un gène modificateur et il a été démontré précédemment qu'il était associé au déclin de la fonction pulmonaire et à un âge plus précoce de la première colonisation par *P. aeruginosa*. Dans cette étude, nous avons examiné la régulation de l'expression du gène *SLC6A14*, au niveau transcriptionnel et au niveau protéique, dans les contextes inflammatoire et infectieux de la mucoviscidose. Nous avons d'abord comparé les niveaux d'ARNm de *SLC6A14* de l'épithélium nasal *ex-vivo* de patients atteints de mucoviscidose et de sujets témoins. Nous avons ensuite étudié l'expression de *SLC6A14* en présence d'interleukine-1 β (IL-1 β), l'une des cytokines pro-inflammatoires les plus fréquemment retrouvées dans les expectorations de patients mucoviscidosiques. Enfin, nous avons examiné la modulation de l'expression du transcrite de *SLC6A14* ainsi que de sa protéine par l'infection à *P. aeruginosa* et par certains de ses facteurs de virulence, notamment le lipopolysaccharide (LPS), la flagelline (FLA) et l'élastase (LasB). Nous avons montré une expression plus élevée de *SLC6A14* dans les cellules nasales chez les patients atteints de mucoviscidose par rapport aux sujets témoins. De plus, nous avons observé une corrélation positive entre le niveau d'expression de *SLC6A14* et l'âge des patients. Nos résultats indiquent que l'expression et la fonction de SLC6A14 sont augmentées par l'IL-1 β et la flagelline de *P. aeruginosa* et ce, dépendamment de la voie de signalisation ERK et/ou p38. Cependant, même si la bactérie entière *P. aeruginosa* induit une augmentation des transcrits de *SLC6A14*, une diminution des niveaux protéiques de SLC6A14 est observée et attribuable à LasB. Ainsi, nous avons pu montrer que les cellules épithéliales bronchiques semblent répondre à l'infection par *P. aeruginosa* et à l'IL-1 β en induisant l'expression de *SLC6A14*, tandis que *P. aeruginosa* sécrète une élastase LasB capable de cliver la protéine SLC6A14. L'expression et la fonction de SLC6A14 sont donc modulées par l'inflammation et l'infection au cours de la mucoviscidose.

*b. Article***Regulation of SLC6A14 expression and function in the inflammatory and infectious context of cystic fibrosis**

Julia Mercier¹, Claire Calmel¹, Erika Sutanto^{2,3}, Anthony Kicic^{2,3,4,5}, J.M. Sallenave⁶ Harriet Corvol^{1,7}, Manon Ruffin^{1*}, Loïc Guillot^{1*}

¹Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint Antoine, F-75012 Paris, France., ²Telethon Kids Institute, University of Western Australia, Nedlands, 6009, Western Australia, Australia., ³School of Public Health, Curtin University, Bentley, 6102, Western Australia, Australia., ⁴Centre for Cell Therapy and Regenerative Medicine, Medical School, The University of Western Australia, Nedlands, 6009, Western Australia, Australia., ⁵Department of Respiratory and Sleep Medicine, Perth Children's Hospital, Nedlands, 6009, Western Australia, Australia., ⁶Université de Paris, Inserm, Centre de Recherche sur l'Inflammation, F-75018 Paris, France., ⁷AP-HP, Hôpital Trousseau, Service de Pneumologie Pédiatrique, F-75012 Paris, France. *co-last author

Corresponding author: Loïc Guillot, Inserm UMR S 938, CRSA, Bât. Kourilsky, 34 Rue Crozatier, 75012 Paris, France ; loic.guillot@inserm.fr

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is characterized by chronic cycles of infection and inflammation responsible for an impairment of the airway epithelium and a decline of the lung function. *Pseudomonas aeruginosa*, the major pathogen found in adults with CF lungs is largely responsible for the aggravation of the lung disease. *SLC6A14*, a gene encoding an amino acid transporter, acts as a modifier gene and was previously shown to be associated with CF lung function decline and with an earlier age of primary colonization with *P. aeruginosa*. In this study, we investigated SLC6A14 regulation in inflammatory and infectious context of CF. We first compared *ex-vivo* nasal epithelial SLC6A14 mRNA expression of people with CF (pwCF) and control subjects. We then studied SLC6A14 expression in presence of interleukin-1 β (IL-1 β), one of the most common pro-inflammatory cytokines found in CF expectorations. Finally, we investigated SLC6A14 modulation by *P. aeruginosa* infection and studied the effect of *P. aeruginosa* virulence factors including lipopolysaccharide (LPS), flagellin (FLA) and elastase (LasB) on SLC6A14 expression and associated signaling pathways. We showed a higher expression of SLC6A14 in nasal cells in pwCF compared to control subjects, which is positively correlated with patient's age. Then, we observed that SLC6A14 expression and function are increased by IL-1 β and *P. aeruginosa* flagellin in a ERK and/or p38-dependant manner. However, even if *P. aeruginosa* whole bacteria induce an increase of *SLC6A14* mRNA expression, a decrease of SLC6A14 protein level is observed and attributable to LasB. In conclusion, during the course of CF disease, the level of SLC6A14 expression and its function may be influence both by inflammation and infection.

Keywords: SLC6A14, cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, LasB, IL-1 β , bronchial epithelial cells

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is the most common rare autosomal recessive fatal disease in the Caucasian population. Lung disease is the leading cause of mortality and morbidity in people with CF (pwCF). The disease is caused by pathogenic variants in the *CF transmembrane conductance regulator (CFTR)* gene^{86–88}, which are responsible for ion transport imbalance across the airway epithelium thus inducing an altered mucociliary clearance. This context favors the development of infections and inflammation leading to progressive lung tissue destruction and respiratory insufficiency. Among all pro-inflammatory cytokines and pathogens found in the airways of adults with CF, IL1- β is the major cytokine^{148,381} and *Pseudomonas aeruginosa* is the most common and life-threatening pathogen. Indeed, the age at first *P. aeruginosa* colonization is a determining factor in the patient's prognosis^{382,383}.

Previous works have identified *SLC6A14* (also called ATB^{0,+}), as a modifier gene. This gene encodes an amino acid transporter with a wide selectivity, allowing to concentrate almost all amino acids, including arginine, within the cell. *SLC6A14* genetic variants were associated with a decreased lung function³¹⁴ and an earlier age at first acquisition of *P. aeruginosa*³²³. We recently demonstrated that *SLC6A14* rs3788766 SNP is associated with a decreased lung function in a large cohort of pwCF³⁸⁴ and that this SNP reduces *SLC6A14* promoter activity in bronchial epithelial cells³⁸⁴. Apart from genetic studies, some groups begin to work on the role of *SLC6A14* in the pathophysiology of CF. Indeed, two independent studies showed that *SLC6A14* expression and function as an arginine transporter are upregulated by *P. aeruginosa* flagellin^{346,385}. Further, *SLC6A14* was shown to be involved in *P. aeruginosa* attachment to human bronchial epithelial cells³⁴⁶. However, the impact of the whole live bacteria on *SLC6A14* expression is unknown. In addition, we previously showed that *SLC6A14* favors bronchial epithelial repair³⁸⁴, and this transporter was also demonstrated to increase *CFTR* function³³⁸. Therefore, there is no doubt that *SLC6A14* has an important role in CF pathophysiology and its study needs to be deepened.

In this study, we investigated *SLC6A14* expression and function regulation in CF inflammatory and infectious contexts. We particularly focused on *SLC6A14* regulation by interleukin-1 β (IL-1 β), *P. aeruginosa* live bacteria or some of its virulence factors, such as lipopolysaccharide (LPS), flagellin (FLA) and LasB elastase.

Material and methods

Reagents

Pa (serotype 10) lipopolysaccharide (LPS) (1 µg/mL) and DMSO were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Purified *P. aeruginosa* flagellin (FLA) was from InvivoGen (San Diego, CA, USA). Interleukin-1β (IL-1β) was from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA). Elastase from *P. aeruginosa*, LasB was from Elastin Products company (Owensville, MO, USA). DMSO was from Sigma Aldrich. SLC6A14 inhibitor α-methyltryptophan (α-MT; M8377; Sigma-Aldrich) was solubilized in 100% methanol (MeOH) to achieve 1, 2.5 or 5 mM (used concentrations are specified in figures legends). Equivalent volumes of MeOH alone were used for control conditions, thus reaching 0.87%, 2.18% and 4.36% respectively. Phosphoramidon (R7385), U0126/MEK inhibitor (662005), SP600125/Jnk inhibitor (S5567) and SB203580/p38 inhibitor (S8307) were from Sigma Aldrich. Monoclonal Anti-TLR5 (IgA2, Q2G4) and Human IgA2 control were from Invivogen.

Cell cultures

Human bronchial epithelial cell lines Calu-3-CFTR-WT and Calu-3 CFTR-KD were kindly provided by Dr. Marc Chanson³⁸⁶ (University of Geneva, Geneva, CH), and cultured as previously described³⁸⁴ in 75 cm² flasks (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) in MEM-Glutamax (Invitrogen) medium supplemented with SVF 10% (Eurobio, Courtaboeuf, France), penicillin-streptomycin (100 U/mL, Invitrogen), essential amino acids 1 mM (Invitrogen), sodium pyruvate 5% (Invitrogen), and HEPES buffer 10 mM (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Calu-3 cells were then seeded in 12 (3-3.5x10⁵ cells/well) wells-plates (TPP) and maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Non-CF and CF primary human bronchial epithelial cells (HBEC) (Epithelix, Planles-Ouates, Switzerland) were grown until confluence on plastic supports (1x10⁵ cells/well) in hAEC culture medium supplemented with antibiotics (Epithelix).

Cell stimulations and Infection with *P. aeruginosa*

Calu-3 cells and primary cells were stimulated with LPS and flagellin for 2 or 6 h or overnight or with IL-1β for 6 h or overnight as indicated in the figure's legends. *P. aeruginosa* laboratory strains (PAO1 WT and PAO1 ΔLasB), were grown in lysogeny broth (LB) medium at 37°C overnight at 110 rpm in a shaker incubator. Bacterial cultures were then centrifugated at 3000 rpm for 15 min. Pellets were washed twice with PBS 1X and resuspended with 500 µL of PBS 1X. We then measured the OD at 600nm and cells were infected with a MOI=0,25 bacteria/cell for 6 h. PAO1 WT and PAO1 ΔLasB secretomes were obtained by successive centrifugations of bacterial suspensions: 4000 g (15 min, 4°C), 6000 g (10 min, 4°C) and 12 000 g (10 min, 4°C) before the remaining supernatants were filter-sterilised using 0.2 µm pore syringe filters, aliquoted and stored at -80°C until use 14. Phosphoramidon (1mM) was preincubated with cell culture medium only or with LasB for 30min, followed by 5 min of cell

stimulation. U0126/MEK inhibitor (20 μ M), SP600125/Jnk inhibitor (20 μ M) and SB203580/p38 inhibitor (20 μ M) were solubilized with DMSO and used, after 30 min of cell deprivation, for 1h of prestimulation followed by 6h of co-stimulation with IL-1 β (20ng/mL) or FLA (50ng/mL). DMSO alone was used as control condition. Purified elastase LasB was used at 25nM on primary cells or 50nM otherwise.

Recombinant SLC6A14 peptide

In order to check SLC6A14 antibody specificity and to study elastase activity, we used a SLC6A14 fusion protein (ref 12857, Proteintech). Its amino acids sequence corresponds to the epitope recognized by our antibody on an extracellular portion of SLC6A14 protein: YSLYYMFASFQSELPWKNCSSWSDKNCSRSPIVTHCNVSTVNGKIQEIIQMNKSWVDINNFTCINGSEIYQPGQLPSEQYWNKVALQRSSGMNETGVIVWYLALCLLLAWLIVGAALFKGIKSSGKV (138-264 aa encoded by BC093710).

RT-qPCR

Calu-3 and hAEC

RNAs were isolated using a NucleoSpin RNA[®] kit (Macherey Nagel, Duren, Germany). RT were performed following High-capacity cDNA reverse transcription kit protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time qPCR was performed with a QuantStudio3 (Applied Biosystems), using TaqMan Fast Universal PCR Master Mix 2X Lo-Rox (Applied Biosystems), TaqMan probes (Applied Biosystems) for *SLC6A14* (hs00924564_m1) and *GAPDH* (hs02786624_g1)) and cDNA as a template. For relative quantification, the amount of target genes was normalized to the expression of GAPDH relative to control cells and was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Nasal cells

The study was approved by Perth Children's Hospital Ethics Committee (#1762) for children with CF and the St. John of Gods Human Ethics Committee (SJOG#901) for children without CF. Children with CF were consented during their annual bronchoscopy whilst children without CF were recruited prior to undergoing elective surgery for non-respiratory related condition. Those with existing bacterial or viral chest infection were excluded from the study and written consent was then obtained from adult participants and parents or guardians of children. Nasal epithelial samples were obtained from the middle nasal turbinate using a soft interdental brush and stored in collection media (RPMI-1640 with 20% (v/v) heat-inactivated FCS). Samples were then processed as previously described (Kicic 2020) and cells were pelleted and resuspended in RLT buffer containing 1% (v/v) b-mercaptoethanol. RNA was extracted using PureLink[®] RNA (Life Technologies) as per manufacturer's protocol. cDNA was then synthesized using random hexamers and Multiscribe[™] Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) in a final reaction volume of 20 μ L containing 1 X RT buffer, 5.5mM MgCl₂, 0.5mM of

each of the dNTPs, 2.5µM random hexamers, 0.4U/µL RNase inhibitor, 0.5U/µL Multiscribe reverse transcriptase and 200ng RNA. The reactions are performed under the following conditions: initial primer incubation step at 25°C for 10 minutes followed by RT incubation at 48°C for 30 minutes and ended by reverse transcriptase inactivation at 95°C for 5 minutes. The cDNA was then used in a final PCR reaction volume of 10µL containing 1 X Taqman PCR master mix (Applied Biosystem), 0.5µL of *SLC6A14* and *PPIA* (Hs04194521_s1) Taqman probes (Applied Biosystems) and 2.5µL of cDNA (1:5). PCR was performed using the QuantStudio 7 (Applied Biosystem). *SLC6A14* expression was normalized to the expression of *PPIA* relative to control cells and was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Protein extraction and Western blotting

Proteins were extracted with RIPA buffer (ThermoScientific) supplemented with antiproteases and antiphosphatase (Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, ThermoScientific) and quantified by Pierce™ BCA Protein Assay Kit protocol (Thermo Fisher Scientific). Nuclear, cytoplasmic and membrane fractions were obtained using Subcellular Protein Fractionation Kit (ThermoScientific). Protein extracts were reduced and size-separated on 4-15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and then transferred on nitrocellulose membrane using iBlot2™ Gel Transfer Device and iBlot2™ Gel Transfer Nitrocellulose Regular Stacks (IB23001, Invitrogen). Membranes were incubated with specific primary antibodies following conditions recommended by the supplier. Membranes were then incubated with corresponding secondary HRP-antibodies. Rabbit anti-SLC6A14 antibody (HPA003193, 1/2000 5% dry-milk TBS-T, O/N) was from Atlas Antibodies (Lund, Sweden). Rabbit anti-GAPDH (#51745, 1/1000, 5% dry-milk TBS-T, O/N) and anti-rabbit HRP (#7074S, 1/5000, 5% dry-milk TBS-T, O/N) were from Cell Signaling Technology (Denver, CO, USA).

Immunofluorescence microscopy

Cells were washed with PBS 1X and fixed with 4% PFA (15 min, RT). Cells were permeabilized in Triton-X-100 0,2% (15 min, RT) blocked in 5% BSA in PBS 1X, and incubated with anti-SLC6A14 primary antibody (1:100, 1h, RT) and then with anti-rabbit secondary antibody (1:10000, 1h, RT, ref #7074, Cell Signaling Technology). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; D9542, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Allemagne) (1/1000 in PBS for 15min). Cells were washed in between steps with PBS 1X and mounted with ProLong™ Gold Antifade Reagent (Invitrogen). Cells were imaged on a Zeiss Axiovert 200 microscope (Zeiss, Le Pecq, France).

ELISA

Concentrations of human IL-8 and IL-6 (R&D, Minneapolis, MN, USA) were measured in cell supernatants using ELISA kits according to the manufacturer's instructions. The 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate was from Cell Signaling Technology.

L-arginin uptake quantification

SLC6A14 amino acid transport was studied as described previously³⁸⁴, using Arginine Monohydrochloride L-[2,3,4-³H] (L-Arginine-2,3-³H, 1 μ Ci/mL, PerkinElmer).

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm SEM and the number of repeated experiments are indicated in the figure legends. GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used to analyze all data. Paired or unpaired t-tests were used to compare two groups as appropriate. One-way or two-way ANOVA were used for comparison of more than two groups and followed by appropriate post-hoc tests (Tukey's, Dunnett's or Bonferroni's multiple comparison tests). Values of p lower than 0.05 were considered to be significant. Non-significant (NS) and statistically significant differences with $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) and $p < 0.0001$ (****) are indicated in the figures.

Results

SLC6A14 expression is modulated in CF context

We first compared SLC6A14 expression using *ex-vivo* nasal epithelial cell of control individuals or pwCF. In average, *SLC6A14* mRNA levels were significantly slightly more expressed in CF nasal epithelial cells (**Fig. 1A**) with a higher variability of expression between samples compared to the control group. Interestingly, we found a positive correlation between *SLC6A14* mRNA expression and CF patients' age (**Fig. 1B**), which is not detected in control individuals (**Fig. 1C**). We also examined SLC6A14 protein levels in bronchial epithelial cells cultivated *in vitro* at the air-liquid interface. Contrary to our expectations, we found that SLC6A14 protein levels were lower in CF patients' bronchial cells compared to non-CF's (**Fig. 1D**). These results prompted us to investigate what could influence SLC6A14 expression and its function.

IL-1 β increases SLC6A14 expression and function in bronchial epithelial cells

SLC6A14 expression was previously shown to be increased in inflammatory context of colonic diseases^{335,364–366,387} such as Crohn's disease, which is characterized by an increase of IL-1 β levels³⁸⁸. During the course of CF, lung inflammation is excessive and becomes chronic, leading to IL-1 β , the main pro-inflammatory cytokine found in CF expectorations¹⁵⁰, surexpression. Besides, we showed that SLC6A14 mRNA levels are positively correlated with pwCF's age. Thus, we hypothesized that IL-1 β could influence SLC6A14 expression and function in CF inflammatory context. Under basal condition, we observed that *SLC6A14* mRNA levels are higher in Calu-3-*CFTR*-KD cells than in isogenic Calu-3-

CFTR-WT cells (**Fig. 2A**). However, we did not detect an increase in arginine transport between these two cell lines (data not shown). Then both Calu-3 cell lines were stimulated with IL-1 β , as confirmed by IL-8 and IL-6 secretion following cells stimulations (**Fig. S1A**). IL-1 β treatment induces an approximately 3-fold increase in *SLC6A14* mRNA expression both in Calu-3-*CFTR*-WT and Calu-3-*CFTR*-KD cell lines (**Fig. 2A**). We confirmed this IL-1 β -dependent *SLC6A14* induction at protein level in Calu-3-*CFTR*-KD cells (**Fig. 2B**). We observed an increase of arginine transport in cells stimulated with IL-1 β (**Fig. 2C**). This increase seems to be mainly *SLC6A14*-dependant as evidenced by arginine uptake measurements following *SLC6A14* blockade with α -MT (**Fig. S2A**). In order to identify signaling pathways involved in this IL-1 β -dependent *SLC6A14* induction, we treated Calu-3-*CFTR*-KD with ERK and p38 inhibitors (**Fig. 2D, 2E**). We observed that ERK and p38 inhibitors prevent the IL-1 β -dependent *SLC6A14* induction at mRNA (**Fig. 2D**) and protein (**Fig. 2E**) levels. Lastly, we confirmed in primary hBECs, the p38-ERK dependent induction of *SLC6A14* mRNA expression (**Fig. 2F**) by IL-1 β , however the arginine transport is not affected (**Fig. 2G**).

Bronchial epithelial cells enhance *SLC6A14* transcription in response to infection but *P. aeruginosa* LasB elastase prevents *SLC6A14* protein levels increase

A progressive increase of airways colonization by *P. aeruginosa* bacteria is observed over the CF patients' lifetime and previous works have shown that flagellin was able to modulate *SLC6A14* expression and function^{346,385}. We wanted to go further to know if this effect was confirmed with the living bacteria, which has many virulence factors. Among these, LasB elastase is an important secreted heat-sensitive virulence factor secreted by *P. aeruginosa* and is involved in the establishment of infection and in lung tissue damage³⁸⁹. In addition, it has been previously showed that this protease is able to degrade host proteins related to CF pathophysiology such as *CFTR* and IL-6²¹². Thus, we infected Calu-3 *CFTR*-KD cells with *P. aeruginosa* PAO1WT and PAO1 Δ LasB strains, and observed a strong increase of *SLC6A14* mRNA with PAO1WT and PAO1 Δ LasB (**Fig. 3A**), associated with a decrease of *SLC6A14* protein levels only after PAO1WT infection (**Fig. 3B and 3C**). To verify that this decrease is specifically related to LasB, we stimulated Calu-3 *CFTR*-KD cells with culture supernatants (SN) from PAO1WT and PAO1 Δ LasB (**Fig. 3D and 3E**). We observed an increase of *SLC6A14* mRNA only with SN PAO1 Δ LasB (**Fig. 3D**). Similar to whole bacteria, a decrease of *SLC6A14* protein is seen only after SN PAO1WT incubation (**Fig. 3E**). This effect is abrogated when the SN is heated (**Fig. S3**). Functionally, *SLC6A14*-dependent arginine transport was induced by PAO1 Δ LasB SN while it was not by PAO1WT SN (**Fig. 3F**). Using purified LasB, we showed that *SLC6A14* mRNA levels are not modulated by this protease (**Fig. 4A**). Still, we demonstrated that purified LasB induces a decrease of *SLC6A14* protein levels (**Fig. 4B and 4C**). LasB-dependent *SLC6A14* protein level decrease is inhibited by the metalloprotease inhibitor phosphoramidon (**Fig. S4A**).

We then hypothesized that LasB could decrease SLC6A14 protein levels by degrading directly the protein. Thus, we tested LasB effect on a recombinant-peptide containing a SLC6A14 extracellular loop amino-acid sequence. Our results showed that LasB but not hNE is able to cleave SLC6A14 recombinant peptide (**Fig. S4B**).

Importantly, we then confirmed these results in primary bronchial epithelial cells from pwCF (CF hBECs) (**Fig. 5**). Indeed, PAO1WT and Δ LasB strains increase *SLC6A14* mRNA levels (**Fig. 5A**) while SLC6A14 protein levels are decreased only by PAO1WT strain (**Fig. 5B**). This decrease is also observed with PAO1WT SN (**Fig. 5C**) and purified LasB (**Fig. 5D** and **S4C**) decrease SLC6A14 protein expression. In contrast, decrease of SLC6A14 is not observed after stimulation by hNE (**Fig. S4C**). The function of SLC6A14 seems to be also affected since arginine transport is decreased by LasB (**Fig. 5E**). Then, we further investigated LasB effect on SLC6A14 protein location in CF hBECs. We showed that SLC6A14, mainly located at the plasma membrane in basal conditions, seems to be internalized and degraded following LasB stimulation (**Fig. 5F**).

***P. aeruginosa* flagellin increases SLC6A14 expression and function in bronchial epithelial cells**

We further attempted to decipher the mechanisms associated in *SLC6A14* mRNA induction observed both in Calu-3 and primary cells (**Fig. 3A** and **5A**). As evocated before, *P. aeruginosa* expresses many virulence factors such as flagellin (FLA) or lipopolysaccharide (LPS), which were shown to increase SLC6A14 expression and function (arginine transport)^{346,385}. Thus, Calu-3 cell lines were stimulated with LPS, FLA or both for 6h. IL-8 and IL-6 were secreted by cells in response to FLA or FLA+LPS stimulations (**Fig. S1B**). Even if IL-8 and IL-6 secretions slightly trended to increase after LPS stimulation, this trend was not statistically significant (**Fig. S1B**). LPS and FLA were able to increase *SLC6A14* mRNA both in Calu-3-*CFTR*-KD and in Calu-3-*CFTR*-WT with no additive effect (**Fig. 6A**). We confirmed the LPS/FLA-dependent SLC6A14 induction at protein level in Calu-3-*CFTR*-KD cells (**Fig. 6B**). We observed an increase of arginin transport in Calu-3-*CFTR*-WT (data not shown) and Calu-3-*CFTR*-KD cell lines stimulated with LPS+FLA combination (**Fig. 6C**). We confirmed that this increase is mainly SLC6A14-dependant as evidenced by arginine uptake measurements following SLC6A14 blockade with α -MT (**Fig. S2B**). Using an anti-TLR5 (FLA receptor) blocking antibody, FLA-dependent *SLC6A14* mRNA induction is completely inhibited (**Fig. 6D**). As observed with IL-1 β , FLA-dependent *SLC6A14* mRNA induction seems to be p38 and ERK dependent (**Fig. 6E**). We were able to confirm these results in CF primary hBECs, with around a 3-fold induction by FLA (**Fig. 6F**).

LasB cleaves *P. aeruginosa* flagellin

Since flagellin from *P. aeruginosa* was able to induce an increase of SLC6A14 expression and function, we hypothesized that the discrepancy observed between the results obtained at the mRNA and protein levels after infection with living PAO1 (**Fig. 3A** vs. **3B** and **Fig. 5A** vs. **5B**) may also be related to an

effect of LasB on flagellin. Indeed, it has been previously shown that LasB is able to cleave flagellin³⁹⁰. We thus exposed Calu-3 *CFTR*-KD cells to FLA alone or in combination with LasB for 2h. We showed that *SLC6A14* mRNA upregulation by FLA was inhibited in presence of LasB (**Fig. 7A**). In the same manner, LasB inhibited the FLA-dependant *SLC6A14*-arginine transport upregulation (**Fig. 7B**). Finally, as expected, we showed that LasB cleaves directly *P. aeruginosa* flagellin (**Fig. 7C**).

Discussion

SLC6A14 is a modifier gene of CF associated with patients' lung function decline³¹⁴ and an earlier age of primary colonization with *P. aeruginosa*³²³. We aimed here to further investigate the impact of CF inflammatory and infectious conditions on *SLC6A14* expression and function. To do so, we focused on pro-inflammatory cytokine IL-1 β and *P. aeruginosa* virulence factors LPS, FLA and LasB.

Firstly, a comparison between pwCF and control individuals showed higher *SLC6A14* mRNA levels in pwCF, with a notable expression heterogeneity among these patients. As we showed in a previous study, *SLC6A14* rs3788766 polymorphism has an impact on *SLC6A14* transcriptional activity³⁸⁴. Thus, *SLC6A14* genetic variations could explain, at least partly, *SLC6A14* expression heterogeneity. Unfortunately, DNA from these patients were unavailable to assess the specific contribution of rs3788766 in the variations observed in nasal samples of pwCF.

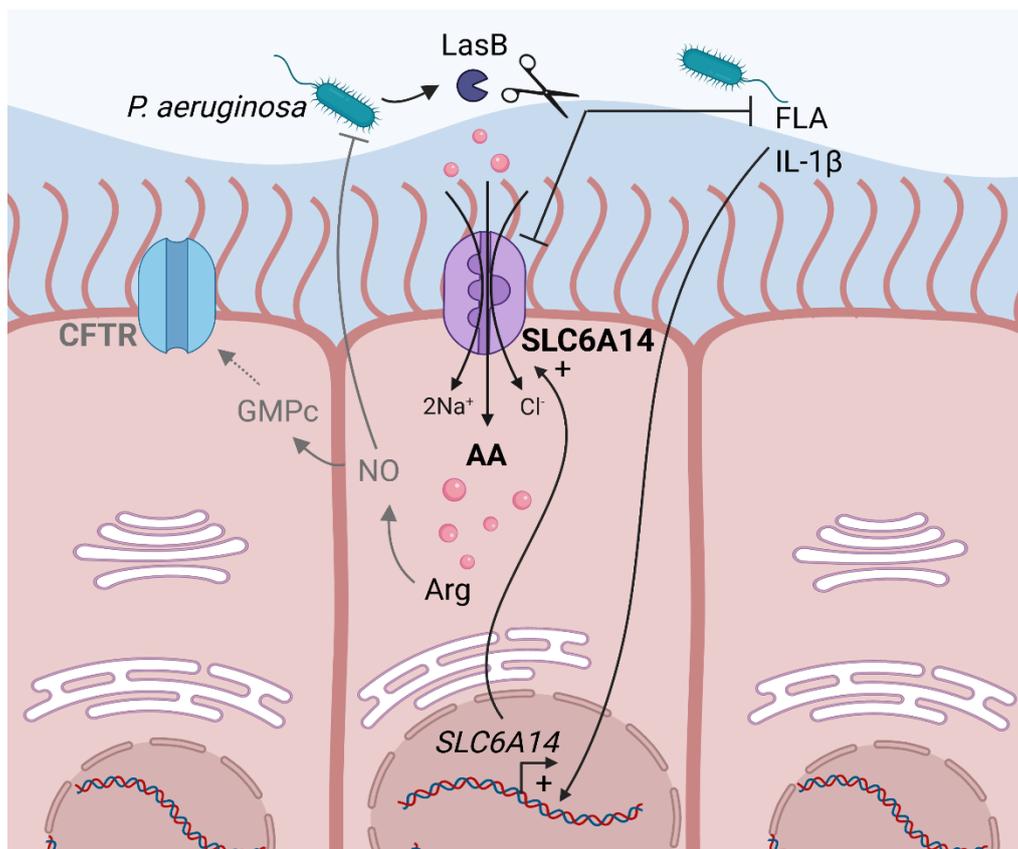
Interestingly, *SLC6A14* mRNA expression increases with age only in pwCF. These observations led us to wonder if *SLC6A14* expression was modulated by inflammatory or infectious contexts characterizing CF pathophysiology. Previous studies demonstrated that flagellin of *P. aeruginosa* increases *SLC6A14* mRNA expression and *SLC6A14*-dependant amino-acid transport in bronchial epithelial airways^{346,385}. Indeed, Di Paola *et al.* showed a >9.5-fold enhancement of *SLC6A14* mRNA expression after a 2h stimulation of ALI Calu-3 cells with purified flagellin from *P. aeruginosa* (1 μ g/mL). Barilli *et al.*, reached the same conclusions after 6h or 24h of Calu-3 stimulation with flagellin (2 μ g/mL and 10 μ g/mL)³⁸⁵. Based on those results, we expected an increase of *SLC6A14* protein levels in primary bronchial cells from pwCF compared to control individuals. Surprisingly, we observed instead a decrease of *SLC6A14* protein expression in pwCF.

We first studied *SLC6A14* expression modulation by CF inflammatory context. IL1- β is the major proinflammatory cytokine found in sputum from CF patients^{148,381}. This cytokine is also found prominently in colonic inflammatory diseases such as Crohn's disease³⁸⁸, in which an induction of *SLC6A14* expression has been observed^{335,336,364-366}. We demonstrated that *SLC6A14* expression and function are directly induced by IL-1 β in bronchial epithelial cells. This data is interesting knowing that our group and others showed that *P. aeruginosa* flagellin induces pro-inflammatory cytokines secretion such as IL-6, IL-8 and IL-1 β ³⁸⁵. We confirmed that *P. aeruginosa* flagellin increases *SLC6A14*

expression and function in bronchial epithelial cell lines and in CF hBECs, as demonstrated before^{346,385} using lower doses of flagellin (50ng/mL). Both IL-1 β and FLA-dependant SLC6A14 expression regulation seem to be p38/ERK signaling dependent. Several recent studies also showed that SLC6A14 upregulation could involve the Jak-STAT pathway^{346,353}.

Flagellin plays a major role in the inflammatory response induced by *P. aeruginosa* in CF bronchial cells^{391,392}, but it is reasonable to assume that it does not recapitulate everything that might happen with the whole bacterium. Using the living bacterium, we showed that SLC6A14 protein levels were decreased following *P. aeruginosa* infection and demonstrated that this decrease is due to LasB. LasB was previously described as able to target membrane proteins including CFTR²¹² and we first showed that LasB is also able to cleave SLC6A14. From these results, we could argue that SLC6A14 function could be theoretically balanced between the inducing effect of flagellin on SLC6A14 and the cleavage of the latter by LasB. Nevertheless, the decrease in SLC6A14 protein levels in the context of live *P. aeruginosa* infection suggests that the effect of LasB on SLC6A14 expression is stronger than flagellin's. Actually, it most likely results from the action of LasB on flagellin itself, since we have shown, confirming another study³⁹⁰, that LasB directly cleaves flagellin, thus inhibiting its upregulation of SLC6A14.

SLC6A14 is a cationic and neutral amino acid transporter which could favor the fight against *P. aeruginosa* colonization as described by Di Paola *et al.*³⁴⁶ On one hand, SLC6A14-dependant arginine uptake could allow a deprivation of amino acids essential to auxotroph bacteria present in the airway surface liquid, leading to a decrease of *P. aeruginosa* survival or attachment³⁴⁶. On the other hand, SLC6A14-dependant arginine uptake could favor intracellular arginine metabolization into nitric oxide (NO), which exhibits bactericidal effects^{393,394}. Thus, we hypothesize that bronchial epithelial cells respond to infection and inflammation by upregulating SLC6A14, following IL-1 β and/or flagellin detection by the host cells. In contrast, LasB secreted by *P. aeruginosa* induces SLC6A14 cleavage, along with flagellin degradation, preventing *P. aeruginosa* detection and SLC6A14 *de novo* synthesis. Therefore, LasB remains a promising therapeutic target, due to its direct action on CFTR but also on SLC6A14, which has been shown to promote CFTR function *via* the NO signaling pathway³³⁸. Thus, SLC6A14 role in CF pathophysiology starts to be elucidated, but mechanistical and functional studies regarding SLC6A14-dependant NO biosynthesis or bacterial proliferation need to be further investigated.



Graphical abstract

References

1. Kerem, B. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245, 1073–1080 (1989).
2. Riordan, J. R. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066–1073 (1989).
3. Rommens, J. M. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245, 1059–1065 (1989).
4. Bonfield, T. L. *et al.* Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 152, 2111–2118 (1995).
5. Schuster, A., Haarmann, A. & Wahn, V. Cytokines in neutrophil-dominated airway inflammation in patients with cystic fibrosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 252 Suppl 1, S59-60 (1995).
6. Nixon, G. M. *et al.* Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J Pediatr* 138, 699–704 (2001).
7. Henry, R. L., Mellis, C. M. & Petrovic, L. Muroid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 12, 158–161 (1992).
8. Corvol, H. *et al.* Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nat Commun* 6, 8382 (2015).
9. Li, W. *et al.* Unraveling the complex genetic model for cystic fibrosis: pleiotropic effects of modifier genes on early cystic fibrosis-related morbidities. *Hum. Genet.* 133, 151–161 (2014).

10. Mercier, J. *et al.* SLC6A14 Modulates Lung Disease Severity in Cystic Fibrosis and Affects mTOR Phosphorylation and Bronchial Epithelial Repair. (2021). doi:10.21203/rs.3.rs-591564/v1.
11. Di Paola, M. *et al.* SLC6A14 Is a Genetic Modifier of Cystic Fibrosis That Regulates *Pseudomonas aeruginosa* Attachment to Human Bronchial Epithelial Cells. *mBio* 8, (2017).
12. Barilli, A. *et al.* Flagellin From *Pseudomonas aeruginosa* Stimulates ATB^{0,+} Transporter for Arginine and Neutral Amino Acids in Human Airway Epithelial Cells. *Front Immunol* 12, 641563 (2021).
13. Ahmadi, S. *et al.* Augmentation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function in Human Bronchial Epithelial Cells via SLC6A14-Dependent Amino Acid Uptake. Implications for Treatment of Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 61, 755–764 (2019).
14. Saint-Criq, V. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator-IL-6-antimicrobial-repair pathway. *Thorax* 73, 49–61 (2018).
15. Sagel, S. D., Chmiel, J. F. & Konstan, M. W. Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proc Am Thorac Soc* 4, 406–417 (2007).
16. Casilag, F. *et al.* The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. *Infect Immun* 84, 162–171 (2016).
17. Al-Sadi, R., Ye, D., Dokladny, K. & Ma, T. Y. Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* 180, 5653–5661 (2008).
18. Eriksson, A., Flach, C.-F., Lindgren, A., Kvifors, E. & Lange, S. Five mucosal transcripts of interest in ulcerative colitis identified by quantitative real-time PCR: a prospective study. *BMC Gastroenterol* 8, 34 (2008).
19. Eriksson, A., Jennische, E., Flach, C.-F., Jorge, A. & Lange, S. Real-time PCR quantification analysis of five mucosal transcripts in patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20, 290–296 (2008).
20. Flach, C.-F. *et al.* Differential expression of intestinal membrane transporters in cholera patients. *FEBS Lett* 581, 3183–3188 (2007).
21. Van der Goten, J. *et al.* Integrated miRNA and mRNA Expression Profiling in Inflamed Colon of Patients with Ulcerative Colitis. *PLoS One* 9, e116117 (2014).
22. Yanai, H. *et al.* Gene expression alterations in ulcerative colitis patients after restorative proctocolectomy extend to the small bowel proximal to the pouch. *Gut* 64, 756–764 (2015).
23. Mao, H. *et al.* Aberrant SLC6A14 Expression Promotes Proliferation and Metastasis of Colorectal Cancer via Enhancing the JAK2/STAT3 Pathway. *Onco Targets Ther* 14, 379–392 (2021).
24. Mohamed, F. B. *et al.* A Crucial Role of Flagellin in the Induction of Airway Mucus Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 7, e39888 (2012).
25. Blohmke, C. J. *et al.* Innate immunity mediated by TLR5 as a novel antiinflammatory target for cystic fibrosis lung disease. *J Immunol* 180, 7764–7773 (2008).
26. Rouillard, K. R., Markovetz, M. R., Bacudio, L. G., Hill, D. B. & Schoenfisch, M. H. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Eradication via Nitric Oxide-Releasing Cyclodextrins. *ACS Infect Dis* 6, 1940–1950 (2020).
27. Cutruzzolà, F. & Frankenberg-Dinkel, N. Origin and Impact of Nitric Oxide in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J Bacteriol* 198, 55–65 (2016).

Figures

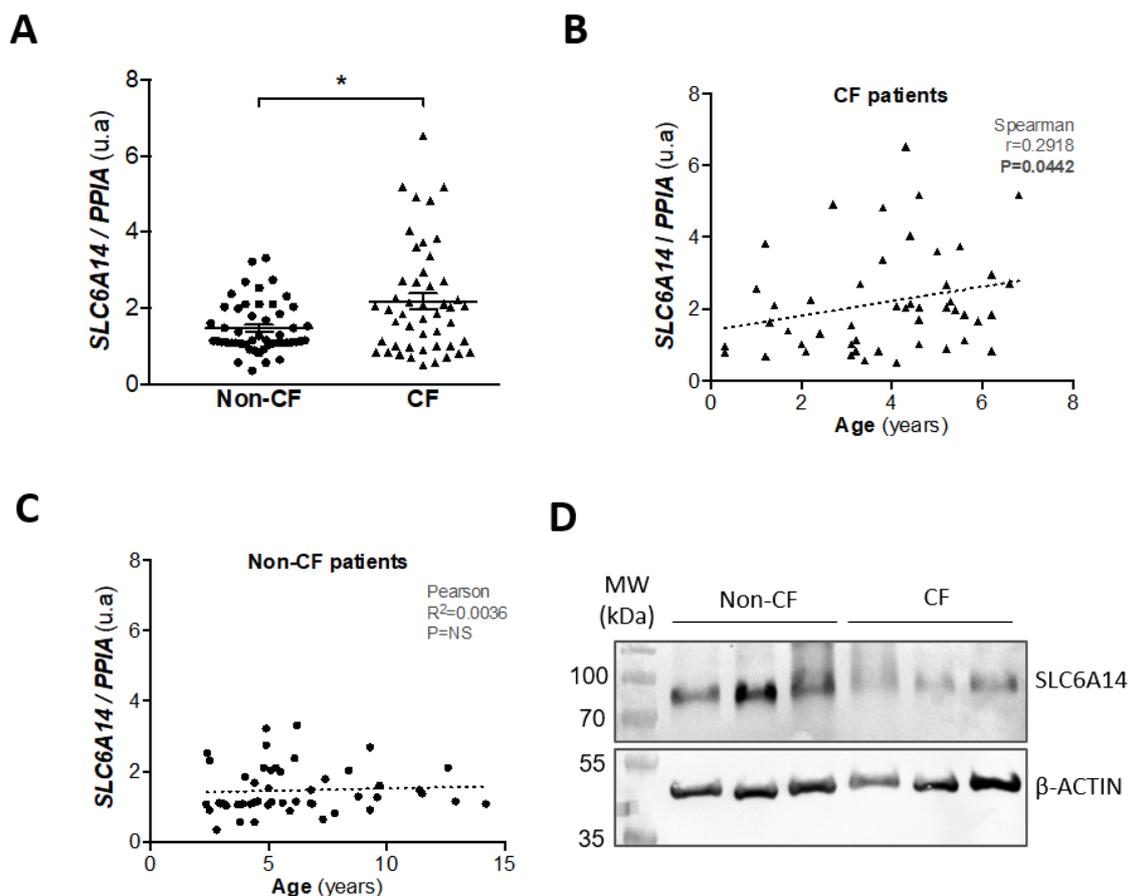


Figure 1. SLC6A14 expression in nasal and bronchial primary epithelial cells. **A.** Relative expression of *SLC6A14* mRNA in non-CF (n=35) or CF (n=48) nasal epithelial cells (*p<0.05, Unpaired t test with Welch's correction). **B.** Positive linear correlation between *SLC6A14* mRNA expression and age in pwCF group (r²=0.2918; p=0.0442; Spearman test). **C.** Absence of correlation between *SLC6A14* mRNA expression and age of control individuals (r²=0.0036; p=NS; Pearson test). **D.** SLC6A14 protein expression in non-CF and CF primary bronchial epithelial cells. (n=3).

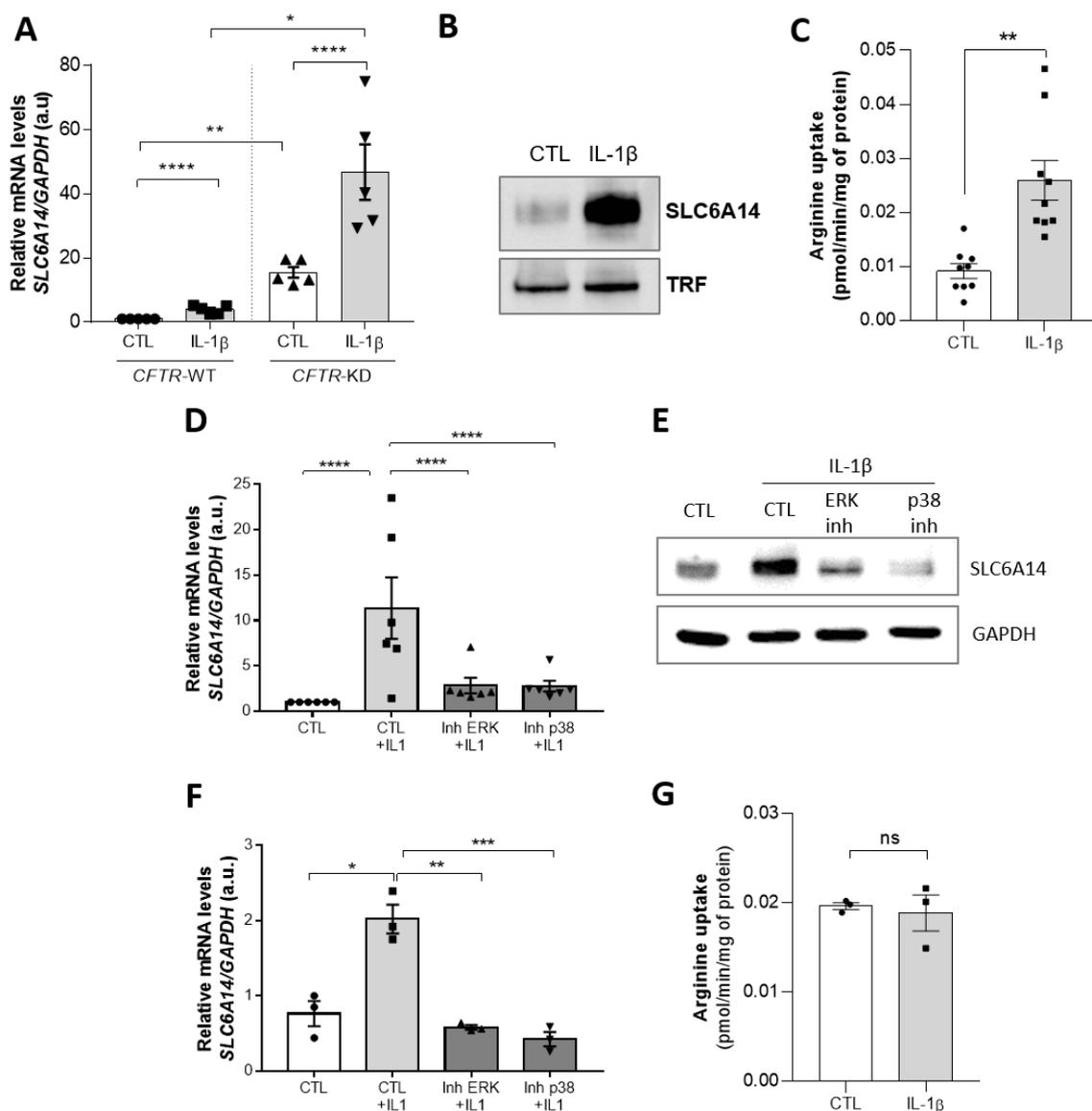


Figure 2. SLC6A14 expression and function are increased by IL-1 β stimulation in Calu-3 CFTR-WT, Calu-3 CFTR-KD and CF bronchial epithelial primary cells. **A.** Relative expression of *SLC6A14* mRNA in Calu-3 *CFTR*-WT and Calu-3 *CFTR*-KD cells stimulated with IL-1 β for 6h (n=5, one-way ANOVA Bonferroni's multiple comparisons test). **B.** Membrane SLC6A14 protein levels in Calu-3 *CFTR*-KD stimulated with IL-1 β for 6h. **C.** Arginin transport of Calu-3 *CFTR*-KD cells stimulated with IL-1 β for 24h (n=9) (paired t test). **D.** Relative expression of *SLC6A14* mRNA in Calu-3 *CFTR*-KD treated with ERK or p38 inhibitors and stimulated with IL-1 β for 6h. (n=6, one-way ANOVA Bonferroni's multiple comparisons test) **E.** SLC6A14 protein levels in Calu-3 *CFTR*-KD pre-treated with ERK or p38 inhibitors for 1h and stimulated with IL-1 β +/- inhibitors O/N. **F.** Relative expression of *SLC6A14* mRNA in CF hBECs treated with ERK or p38 inhibitors and stimulated with IL-1 β for 6h (N=1, n=3; one-way ANOVA Bonferroni's multiple comparisons test). **G.** SLC6A14-dependant arginin transport in CF hBECs stimulated with IL-1 β for 24h (n=3, paired t-test).

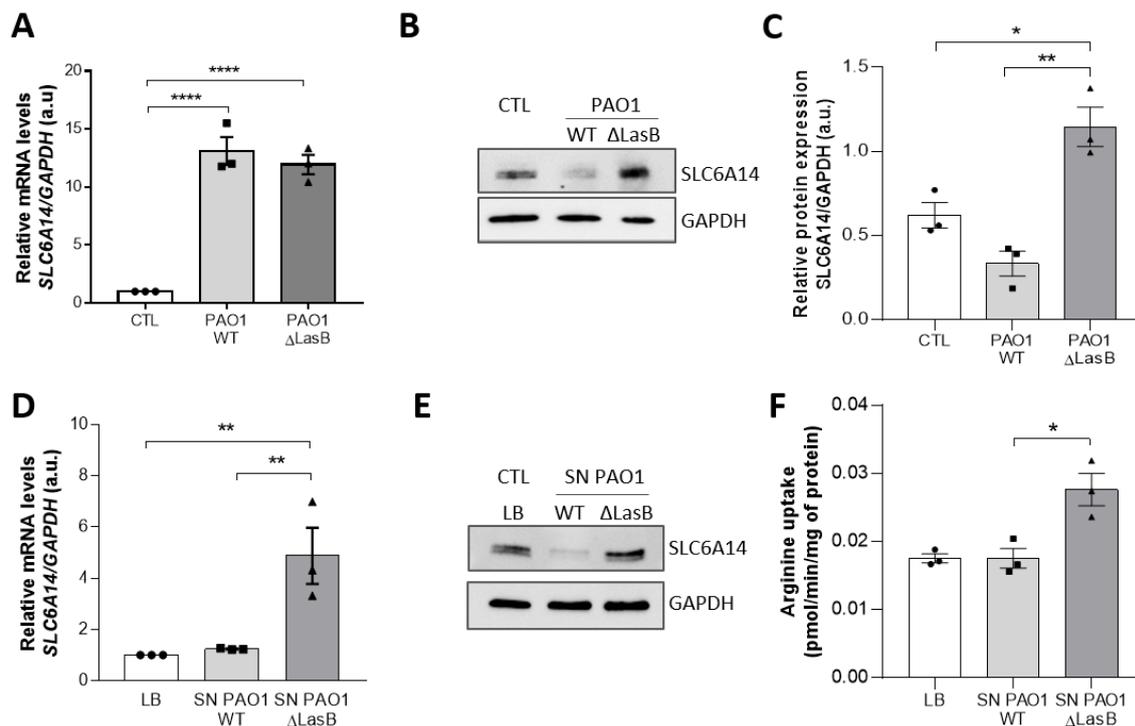


Figure 3. SLC6A14 expression and function are modulated by *P. aeruginosa* elastase LasB in Calu-3 *CFTR*-KD cells. **A.** Relative expression of *SLC6A14* mRNA, **B.** western blot and **C.** quantification of SLC6A14 protein levels in cells infected with PAO1 WT and PAO1 Δ LasB (O/N, MOI=0,25, n=3, one-way ANOVA Bonferroni's multiple comparisons test). **D.** Relative expression of *SLC6A14* mRNA (n=3) and **E.** SLC6A14 protein levels in cells stimulated by PAO1 WT heated or control and PAO1 Δ LasB secretomes (2-5%) for 1h. **F.** SLC6A14-dependant arginine uptake in cells stimulated by PAO1 WT and PAO1 Δ LasB secretomes (2%) (O/N, n=3, one-way ANOVA Bonferroni's multiple comparisons test).

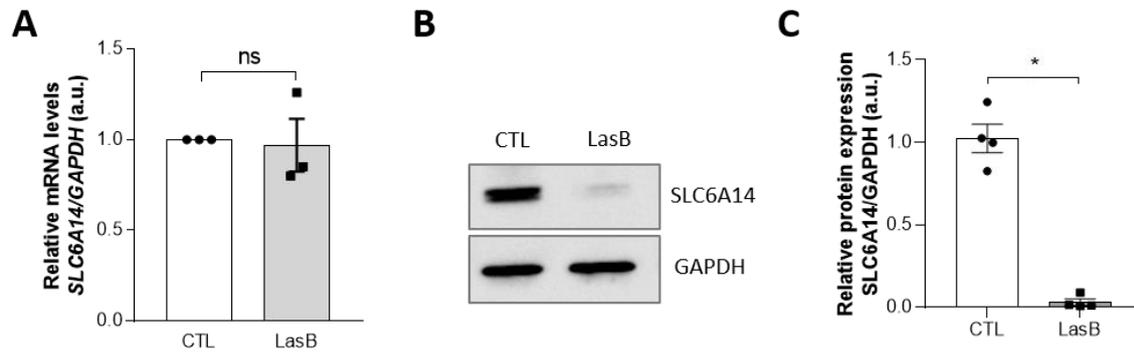


Figure 4. Purified *P. aeruginosa* elastase decreases SLC6A14 protein expression. **A.** Relative expression of *SLC6A14* mRNA, (n=3, Mann-Whitney test) **B.** representative western blot and **C.** quantification of SLC6A14 protein levels in Calu-3 *CFTR*-KD cells stimulated by LasB for 5min (n=4, Mann-Whitney test).

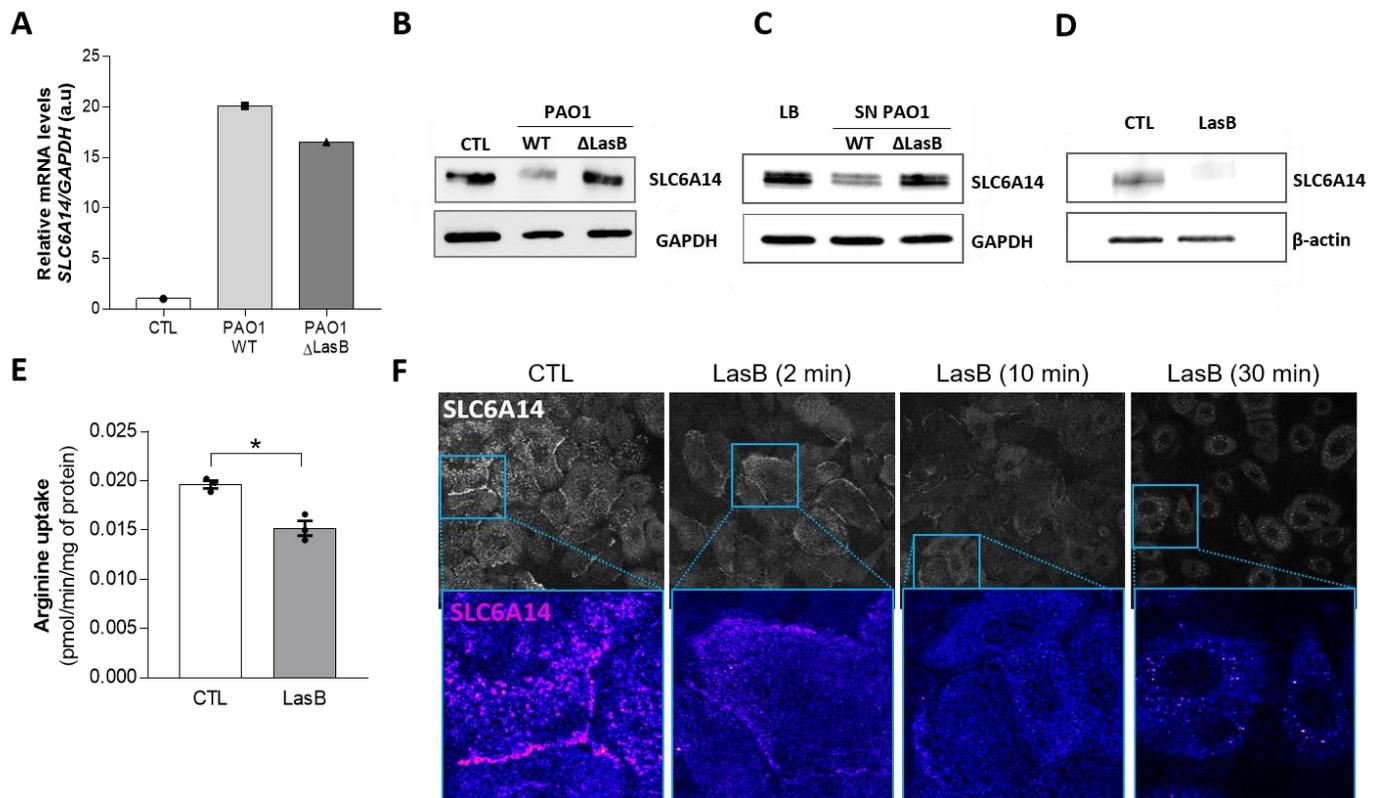


Figure 5. SLC6A14 expression and function are modulated by *P. aeruginosa* elastase LasB in CF hBECs. **A.** Relative expression of SLC6A14 mRNA or **B.** protein levels in cells infected with PAO1 WT or PAO1 Δ LasB (6h, MOI=0,25). **C.** SLC6A14 protein levels in cells stimulated with PAO1 WT or PAO1 Δ LasB secretomes (5%) for 1h. **D.** SLC6A14 protein levels in cells stimulated by LasB for 6h. **E.** SLC6A14-dependant arginine uptake in CF hBECs stimulated by LasB for 1h. (n=3, Mann-Whitney test) **F.** Immunofluorescence showing SLC6A14 protein location following exposure to LasB for 0, 2, 10 or 30 min.

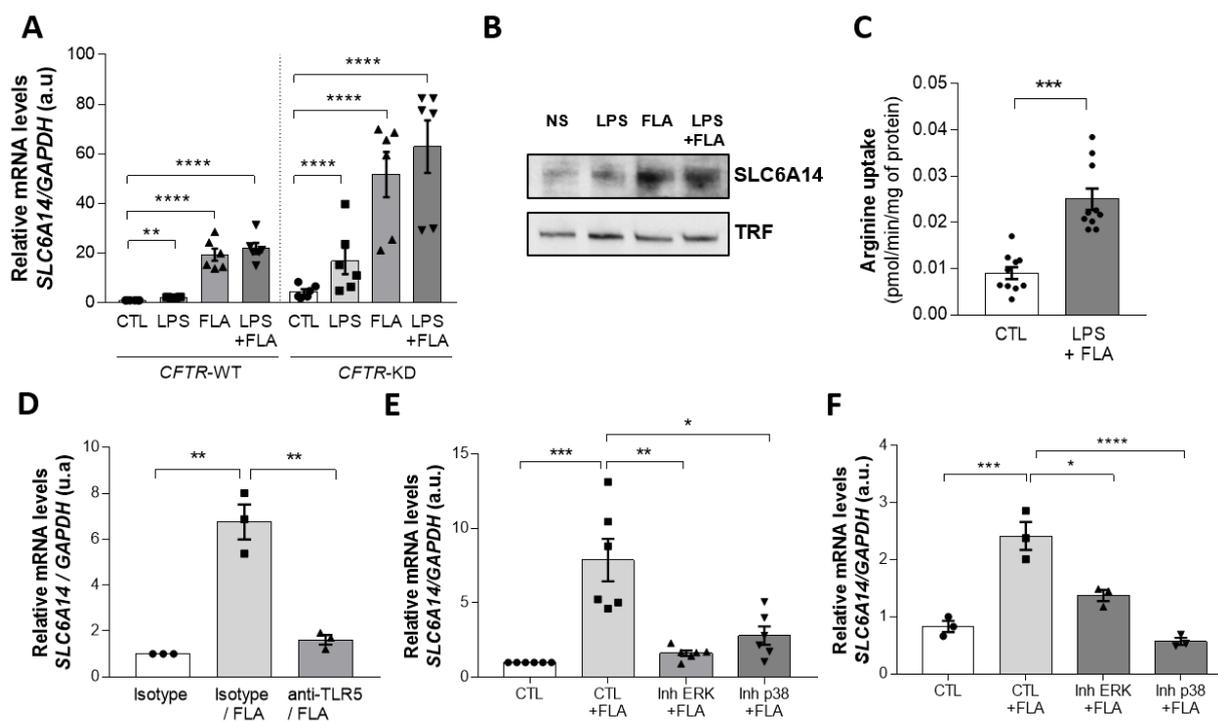


Figure 6. SLC6A14 expression and function are increased by *P. aeruginosa* lipopolysaccharide (LPS) and flagellin (FLA) in Calu-3 CFTR-WT, Calu-3 CFTR-KD and primary human bronchial epithelial cells. **A.** Relative expression of *SLC6A14* mRNA in Calu-3 CFTR-WT and Calu-3 CFTR-KD cells stimulated with LPS and FLA for 6h (n=6 per group, two-way ANOVA Dunnett’s multiple comparisons test). **B.** Membrane SLC6A14 protein levels in Calu-3 CFTR-KD stimulated with LPS or FLA or both for 6h. **C.** SLC6A14-dependant arginin uptake in Calu-3 CFTR-KD cells stimulated with LPS and FLA for 24h (n=10, paired t test). **D.** Relative expression of *SLC6A14* mRNA in Calu-3 CFTR-KD cells cultured in air-liquid interface and stimulated with FLA in combination with anti-TLR5 blocking antibody. (n=3, one-way ANOVA Bonferroni’s multiple comparisons test) **E.** Relative expression of *SLC6A14* mRNA in Calu-3 CFTR-KD (n=6) or **F.** CF hBECs (n=3) treated with ERK or p38 inhibitors and stimulated with FLA for 6h.

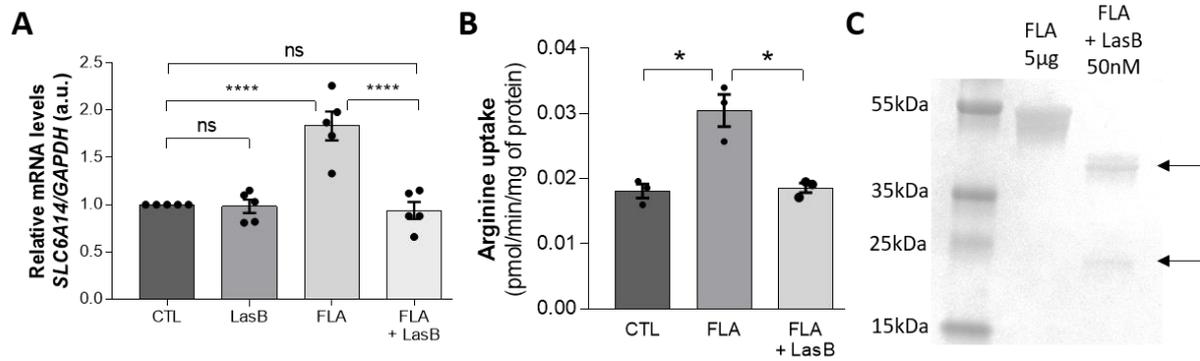


Figure 7. LasB cleaves flagellin and inhibits its effect on SLC6A14 mRNA expression and function. **A.** Relative expression of *SLC6A14* mRNA in Calu-3 *CFTR*-KD cells stimulated by LasB, FLA or both for 2h (n=5, one-way ANOVA Bonferroni's multiple comparisons test). **B.** SLC6A14-dependant arginine uptake in Calu-3 *CFTR*-KD cells stimulated by FLA alone or in combination with LasB for 4h. Culture media were then replaced by complete medium O/N (n=4, Tukey's multiple comparisons test). **C.** Stain blue gel of purified FLA alone or incubated with LasB for 2h.

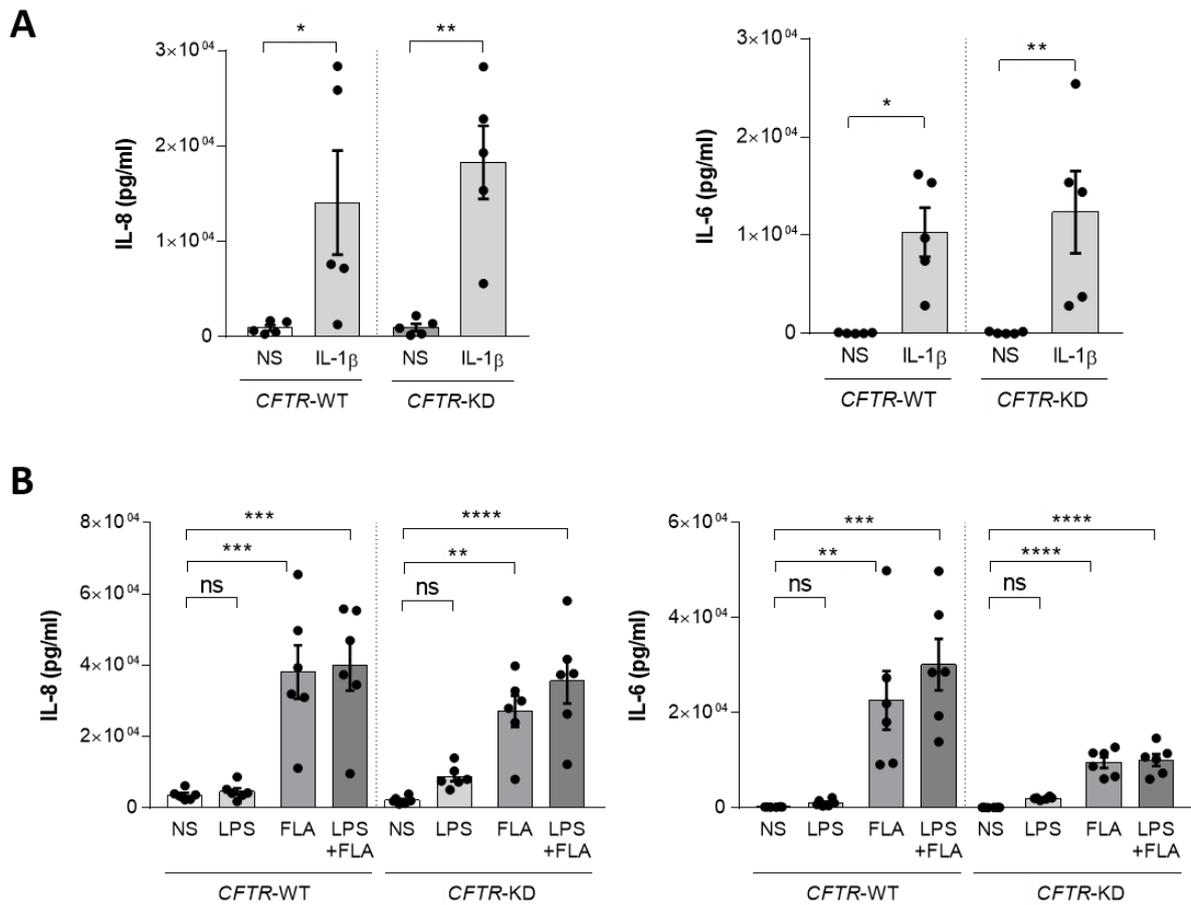


Figure S1. IL-6 and IL-8 secretion are induced by IL-1 β , LPS and FLA stimulation in Calu-3 cells. **A.** Pro-inflammatory cytokines expression (IL-8, left; IL-6, right) in response to IL-1 β stimulation in Calu-3 cells (n=5, one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test). **B.** Pro-inflammatory cytokines expression (IL-8, left; IL-6, right) in response to LPS and/or FLA stimulation in Calu-3 cells (n=6, one-way ANOVA Bonferroni's multiple comparisons test).

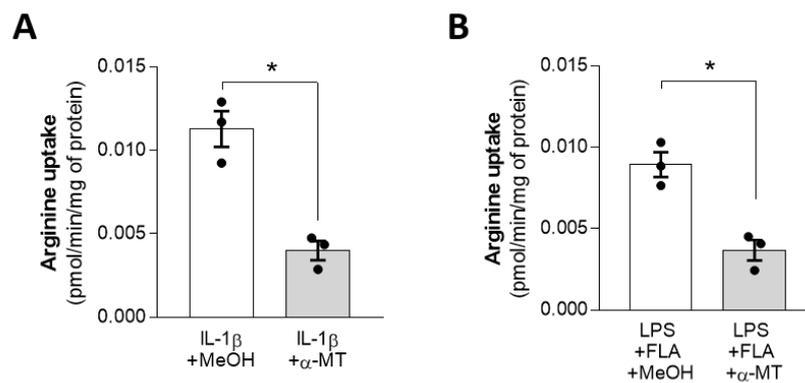


Figure S2. SLC6A14-dependant arginine uptake after IL-1 β or LPS+FLA stimulations. A. SLC6A14-dependant arginin transport in Calu-3 *CFTR*-KD treated with α -MT and stimulated with IL-1 β for 24h (n=3, paired t-test). **B.** SLC6A14-dependant arginin transport in Calu-3 *CFTR*-KD treated with α -MT and stimulated with LPS and FLA for 24h (n=3, paired t-test).

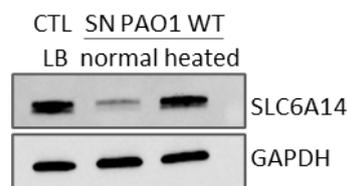


Figure S3. SLC6A14 protein levels are decreased by a heat-sensitive protease secreted by *P. aeruginosa*. Western blot of Calu-3 *CFTR*-KD cells stimulated with sterile culture medium (LB), control PAO1WT culture medium (normal) or heat-denatured PAO1WT culture medium (heated) for 1h (5%).

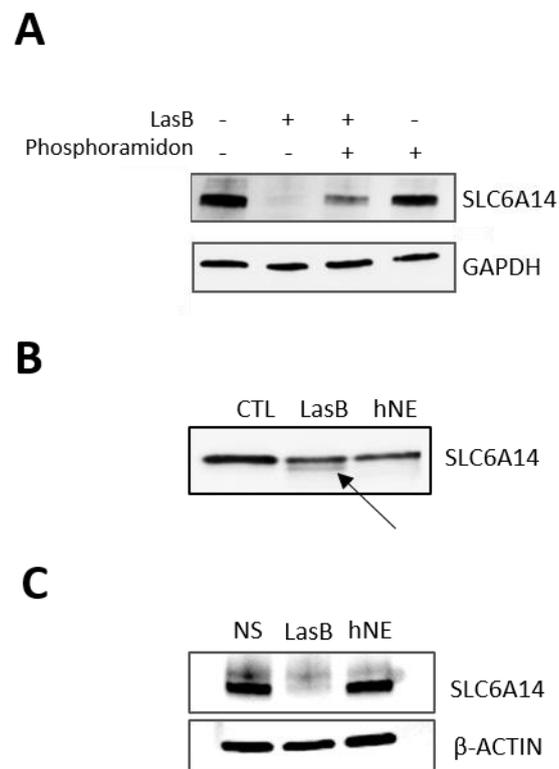


Figure S3. SLC6A14 protein expression is decreased by *P. aeruginosa* elastase LasB. A. SLC6A14 protein levels in Calu-3 CFTR-KD cells stimulated by LasB for 5 min after 30min of incubation with or without phosphoramidon (1mM). **B.** Western blot of SLC6A14 recombinant peptide digested by LasB or hNE for 1h. **C.** SLC6A14 protein levels in CF hBECs cultured in air-liquid interface and stimulated by LasB or hNE for 3h.

Discussion et Perspectives

La mucoviscidose est une pathologie complexe, combinant des atteintes multi-organes et dont la sévérité est très variable en fonction des variants génétiques de *CFTR*, des facteurs environnementaux et des gènes modificateurs. Parmi ces derniers, le gène *SLC6A14* est particulièrement intéressant de par son association avec les phénotypes digestifs et respiratoires des patients atteints de mucoviscidose^{314,323,325,327}. *SLC6A14* semble ainsi avoir un rôle pléiotrope majeur dans la physiopathologie de la mucoviscidose³³⁰.

Au cours de notre étude, nous avons pu confirmer l'association génétique du SNP rs3788766 de *SLC6A14* et la fonction pulmonaire dans une importante cohorte française de patients mucoviscidosiques (n= 3257). L'allèle G du rs3788766 est associé à une diminution de la fonction respiratoire, confirmant les données de la littérature^{323,325}. En effet, Li *et al.* ont réalisé une étude d'association génétique sur une cohorte canadienne d'une précédente étude³²⁷ et ont montré que le rs3788766 est associé à une diminution de la fonction respiratoire ainsi qu'à un âge plus précoce de colonisation des voies aériennes par *P. aeruginosa*³²³. D'autres SNP de *SLC6A14* associés à la fonction pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose ont également été identifiés, soit par GWAS³¹⁴, soit par génotypage³³⁰. Sun *et al.*, quant à eux, ont démontré l'association du rs3788766 avec l'apparition d'une atteinte digestive observée chez les nouveau-nés mucoviscidosiques : l'iléus méconial³²⁷. Ces résultats ont été confirmés ultérieurement dans une étude génomique à grande échelle incluant 6770 patients atteints de mucoviscidose³²². Ces multiples données semblent souligner l'implication majeure du SNP rs3788766 de *SLC6A14* dans la variabilité des phénotypes digestifs et respiratoires observés chez les patients. Pour autant, aucune étude fonctionnelle du rs3788766 n'avait encore été réalisée.

En effet, que ce soit dans la mucoviscidose ou dans d'autres pathologies, les conséquences du polymorphisme de *SLC6A14* sur l'expression ou la fonction de la protéine n'ont jamais été étudiées. Cette lacune de connaissances doit être comblée afin de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels *SLC6A14* impacte les différents phénotypes ou maladies décrits précédemment. Les SNP de *SLC6A14* cités jusqu'à présent sont situés dans la région non codante du gène. En effet, ils sont situés soit dans la région intergénique, soit dans la région régulatrice (promoteur), les introns, ou encore dans la région 3'UTR de *SLC6A14*. La localisation de ces SNP ne modifie pas la séquence d'acides aminés de la protéine *SLC6A14*.

Cependant, ces variants peuvent avoir de multiples effets non seulement sur *SLC6A14*, mais également sur des gènes proches et/ou distants. Par exemple, des SNP situés dans le promoteur peuvent affecter l'activité transcriptionnelle en modifiant la liaison du facteur de

transcription. D'autres conséquences fonctionnelles de ces SNP doivent être envisagées et étudiées, notamment la méthylation de l'ADN et les modifications des histones, l'épissage alternatif, la conformation et la stabilité de l'ARNm ainsi que la structure, le niveau d'expression et la fonction des protéines. Même si les outils bioinformatiques peuvent prédire les conséquences fonctionnelles de ce polymorphisme, des études expérimentales *in vitro/in vivo* en aval sont également nécessaires. Utilisées avec succès pour plusieurs traits complexes, les technologies d'édition du génome peuvent également être utilisées pour créer des lignées cellulaires isogéniques avec des allèles spécifiques pour évaluer leur fonctionnalité, y compris la structure de la chromatine, la liaison du facteur de transcription, l'expression des gènes et des protéines et des tests cellulaires spécifiques³⁹⁵. De plus, l'étude d'associations de plusieurs SNP, ou haplotypes, pourrait permettre d'expliquer davantage certains phénotypes. Par ailleurs, en supplément de l'impact des différents SNP, l'expression de *SLC6A14* peut être régulée par des facteurs environnementaux (molécules inflammatoires, agents pathogènes et traitements pharmacologiques) et éventuellement par l'âge³³⁰. Ainsi, le développement de différents modèles expérimentaux permettant d'identifier la causalité des modulations de l'expression de *SLC6A14* et la variabilité de sa fonction au cours de la progression de la maladie est un défi majeur.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes demandé si, de par la localisation du rs3788766 au niveau du promoteur de *SLC6A14*, différents variants pouvaient avoir un impact sur la transcription du gène. Nous avons pu démontrer que la présence de l'allèle G du rs3788766 entraîne une diminution de l'activité du promoteur de *SLC6A14* dans une lignée de cellules épithéliales bronchiques, suggérant un impact de ce variant sur l'expression du gène. Il est néanmoins important de noter que les variations des niveaux de luciférase reflétant l'activité du promoteur restent assez faibles, de même que les variations de la fonction respiratoire des patients porteurs de l'allèle G, qui présentent une diminution du VEMS de ~1%. Des études complémentaires seraient pertinentes telles que l'analyse de l'activité luciférase dans des cellules épithéliales bronchiques primaires ou encore l'étude des niveaux transcriptomiques et protéiques de *SLC6A14* à la suite d'une transfection avec des plasmides contenant les différents variants de *SLC6A14*. Pour ce faire, l'utilisation de modèles cellulaires d'inactivation de *SLC6A14*, déjà utilisés dans certains laboratoires, seraient utiles. Nous pouvons également imaginer l'utilisation de modèles cellulaires isogéniques dans lesquels auraient été remplacé l'allèle A par l'allèle G au niveau du rs3788766. Néanmoins, les faibles niveaux de variations observés jusqu'à présent nous portent à croire qu'il serait difficile d'observer une variation au

niveau protéique, cela restant à démontrer. Par ailleurs, l'étude des prélèvements nasaux d'une cohorte australienne (patients atteints de mucoviscidose, n=44, individus contrôles, n=48) a indiqué une expression de *SLC6A14* en ARNm supérieure mais surtout plus variable chez les patients atteints de mucoviscidose comparés aux individus contrôle. Il aurait été intéressant d'obtenir les protéines correspondant aux mêmes échantillons ainsi que le génotype des patients. En effet, peut-être aurions-nous remarqué une augmentation d'expression de *SLC6A14* aux niveaux transcriptomique et protéique chez les patients porteurs de l'allèle A du rs3788766, tandis que cette augmentation n'aurait pas été observée chez les patients porteurs de l'allèle G. Malheureusement, nous ne disposons pas de ces données pour le vérifier.

Ainsi, nous avons montré pour la première fois que le polymorphisme de *SLC6A14* peut influencer sur sa transcription dans le contexte de la mucoviscidose. En effet, jusqu'à présent l'expression et la fonction de *SLC6A14* ont été majoritairement étudiées dans le cadre de la recherche sur le cancer³⁵⁰. Sikder *et al.* ont notamment montré que la fonction de *SLC6A14*, transporteur membranaire d'acides aminés, favorise la prolifération cellulaire et les processus d'invasion dans la lignée de cellules cancéreuse de colon LS174T³⁵⁴. De plus, les processus de migration et de prolifération ont également été étudiés dans des cellules colorectales HCT-116 et Caco-2 surexprimant ou sous-exprimant *SLC6A14*³⁵³. Mao *et al.* ont ainsi montré qu'une surexpression de *SLC6A14* favorise la migration et la prolifération cellulaire tandis qu'une sous-expression, au contraire, inhibe ces processus physiologiques³⁵³. L'inhibition de *SLC6A14* par un inhibiteur pharmacologique, l' α -méthyl-DL-tryptophane (ou α -MT), qui agit de manière stérique, a le même effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire³⁵³. De manière similaire, l'implication de *SLC6A14* dans la prolifération cellulaire a été démontrée dans d'autres types cancéreux tels que le cancer du pancréas³⁵⁵. Nous nous sommes ainsi demandés si *SLC6A14* pouvait également être impliqué dans la réparation épithéliale. En effet, la réparation épithéliale, qui inclut des processus de prolifération cellulaire, migration et différenciation, est altérée chez les patients atteints de mucoviscidose, dont les infections et inflammations chroniques provoquent des lésions progressives de l'épithélium bronchique²⁵⁹. Nos résultats obtenus sur des lignées de cellules épithéliales bronchiques Calu-3 ainsi que sur des cellules épithéliales primaires traitées avec de l' α -MT nous indiquent que l'inhibition de *SLC6A14* induit également une diminution de la réparation épithéliale au niveau pulmonaire. Par ailleurs, nous avons également réalisé des études préliminaires de prolifération cellulaire sur une autre lignée cellulaire épithéliale bronchique, les NCI-H292, indiquant que *SLC6A14* favorise la prolifération cellulaire au niveau pulmonaire. Des expériences de confirmation utilisant des

cellules cultivées en interface air-liquide, et donc différenciées, ainsi que des siARN dirigés contre l'ARNm de *SLC6A14* sont en cours. L'utilisation de l' α -MT - analogue structural du tryptophane non transporté par SLC6A14 et originellement développé comme traceur de neurones sérotoninergiques³⁹⁶⁻³⁹⁸ - comme seul moyen d'inhibition de SLC6A14 peut être discutée. En effet, bien que largement utilisé en tant qu'inhibiteur spécifique de SLC6A14^{328,339,358,399-402}, sa spécificité n'a pas été clairement démontrée et reste supposée⁴⁰³. L' α -MT aurait notamment un effet bloquant sur un autre transporteur d'acides aminés, Slc36a2, dans des ovocytes de xénope exprimant le gène *Slc36a2* de rat⁴⁰⁴. Chez l'homme, ce transporteur est exprimé majoritairement au niveau rénal et musculaire, mais *a priori* pas au niveau pulmonaire (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q495M3>; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000186335-SLC36A2/tissue>). Néanmoins, nous avons également réalisé des expériences de transport d'arginine dans des 16-HBE, un autre type cellulaire bronchique humain n'exprimant que très faiblement le gène *SLC6A14*, et n'avons pas observé d'inhibition significative du transport d'arginine en présence d' α -MT. Ces résultats appuient l'hypothèse d'une spécificité assez importante de cet inhibiteur pour SLC6A14 et non pour d'autres transporteurs pouvant être présents à la surface de ces cellules.

L'implication de SLC6A14 dans les processus de réparation épithéliale et de prolifération cellulaire étant alors bien établie, nous nous sommes intéressés à la voie de signalisation mTOR. Cette voie de signalisation permet l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme, essentiels aux phénomènes physiologiques tels que la croissance et la prolifération cellulaire, elle-même impliquée dans la réparation épithéliale. La voie mTOR est connue pour être activée en présence suffisante de nutriments et d'acides aminés tels que l'arginine et la leucine⁴⁰⁵, pouvant être importés par SLC6A14. Par ailleurs, l'implication de ce dernier dans la voie mTOR a été démontrée dans des cellules pancréatiques cancéreuses, dans lesquelles l'inhibition stérique de SLC6A14 induit une diminution de la phosphorylation de différents acteurs en aval de mTOR : 4E-BP1, S6K et eIF-2 α ³⁵⁵. Le lien entre SLC6A14 et mTOR a également été démontré dans la lignée cellulaire LS174T issue de cancer du côlon³⁵⁴. A notre connaissance, nous sommes les premiers à confirmer ce lien dans des cellules bronchiques. De manière intéressante, nous avons pu observer une diminution de la phosphorylation de mTOR après inhibition de SLC6A14 par l' α -MT mais ce, uniquement dans des cellules épithéliales bronchique primaires issues d'individus contrôles et de patients mucoviscidosiques. Nous n'avons jamais pu mettre en évidence une telle diminution dans la lignée cellulaire Calu-3. Cela pourrait hypothétiquement s'expliquer par le fait que les cellules épithéliales bronchiques

primaires, cultivées de manière immergée, présentent un phénotype similaire à des cellules basales, tandis que les Calu-3 expriment plutôt un phénotype glandulaire. Ces expériences seront réitérées au laboratoire sur des cellules primaires et la lignée Calu-3 différenciées en interface air-liquide, ainsi qu'après utilisation d'un siARN dirigé contre *SLC6A14* pour les raisons explicitées précédemment. De plus, les conditions expérimentales utilisées ici ne nous ont pas permis de mettre en évidence un changement d'état de phosphorylation d'acteurs situés en aval de mTOR, comme ce fut le cas dans l'étude de Coothankandaswamy *et al.*³⁵⁵. C'est pourquoi nous ne nous prononçons pas sur l'effet de *SLC6A14* sur l'activation de mTOR, mais bien sur son état de phosphorylation. Il serait donc intéressant de tester de nouveaux temps de stimulation par l' α -MT, en plus des expériences utilisant des siARN, afin de trouver la bonne « fenêtre » sachant que les processus de phosphorylation/déphosphorylation sont très rapides et dynamiques. D'autre part, l'utilisation de modèles cellulaires différenciés permettra peut-être à elle seule d'observer ces changements.

Le lien direct entre *SLC6A14*, mTOR et la réparation épithéliale bronchique n'est cependant pas encore très clair. En effet, bien que l'implication de mTOR dans la réparation épithéliale et le rétablissement, après lésion, de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal ait été démontrée⁴⁰⁶, la principale voie de signalisation décrite comme étant impliquée dans la réparation et la régénération pulmonaires est la voie Wnt⁴⁰⁷. De manière intéressante, *SLC6A14* a récemment été identifié comme une cible de la voie Wnt- β caténine³⁵⁴, renforçant l'hypothèse du lien entre *SLC6A14* et la réparation épithéliale bronchique. Diverses ressources bibliographiques indiquent que des interconnexions (ou « *cross-talk* ») complexes existent entre la voie PI3K-Akt-mTOR et la voie Wnt- β caténine, qui s'activent mutuellement, notamment via les facteurs Akt et β -caténine⁴⁰⁸. Par ailleurs, Wnt et Akt vont également activer mTORC1⁴⁰⁸, responsable de la croissance, prolifération et survie cellulaire⁴⁰⁹. Wnt active d'autre part mTORC2 qui, à son tour, active Akt⁴⁰⁸. Parmi ces différentes boucles, schématisées dans la **Figure 29**, Akt est également impliqué dans le trafic de *SLC6A14* vers la membrane plasmique *via* sa phosphorylation et celle de SEC24C⁴¹⁰. Malgré le fait que *SLC6A14*, de par son import d'acides aminés dont la leucine et l'arginine, peut activer mTORC1 et donc la croissance et prolifération cellulaire, il serait intéressant d'étudier son effet sur mTORC2, qui reste encore assez peu décrit à ce jour. Nous avons mis en évidence une diminution de la phosphorylation de mTOR lors de l'inhibition de *SLC6A14*, et pouvons donc supposer que *SLC6A14* peut également activer mTORC2, qui induit l'activation d'Akt puis de la voie Wnt-

β caténine et donc la réparation épithéliale. Ainsi, le lien entre SLC6A14, mTOR et la réparation épithéliale serait un peu plus explicite.

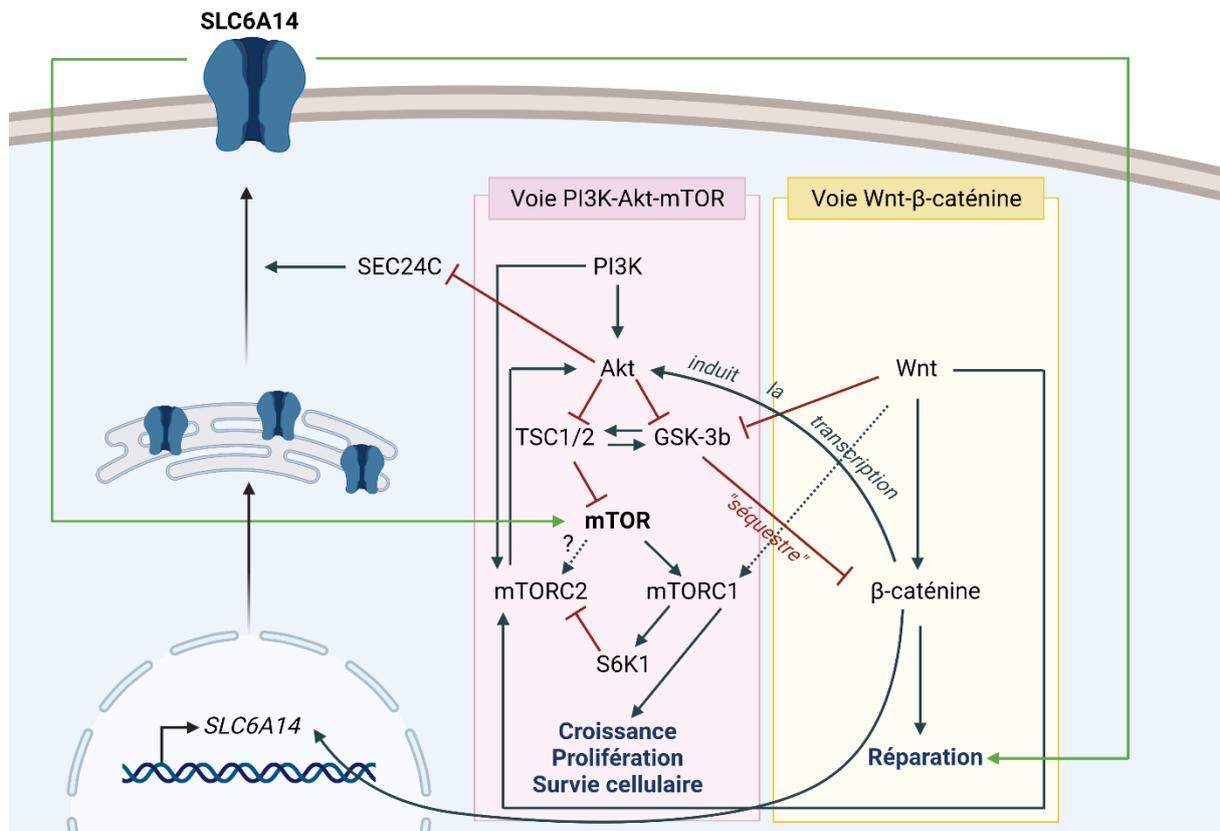


Figure 29. Interactions entre SLC6A14 et les voies de signalisation PI3K-Akt-mTOR et Wnt- β -caténine. Les flèches vertes représentent nos résultats tandis que les autres interactions représentées compilent des données issues de la littérature⁴⁰⁸

Par ailleurs, l'activation de mTORC1 est connue pour inhiber la voie de l'autophagie^{405,411}. Cette dernière est considérée comme une potentielle cible thérapeutique pour les patients atteints de mucoviscidose, dont le défaut de CFTR compromet l'autophagie notamment *via* la déplétion de la protéine pro-autophagique essentielle Beclin 1 (BECN1)⁴¹²⁻⁴¹⁵. Sachant que l'autophagie est défectueuse chez les patients et que certaines thérapies visent à l'induire, l'activation de SLC6A14 dans ce cas semble donc contre-indiquée puisqu'il aurait théoriquement tendance à l'inhiber. En effet, l'utilisation d' α -MT sur des cellules LS174T, une lignée de cellules de cancer du côlon, induit l'autophagie³⁵⁰. Nous avons pu confirmer l'induction de la voie de l'autophagie par RNAseq, réalisé sur des cellules épithéliales bronchiques primaires différenciées et traitées par de faibles doses d' α -MT (1 mM) pendant 1 h, 6 h ou 24 h (**Annexe 2**). Pour autant, malgré un effet d'inhibition de l'autophagie, l'activation de SLC6A14 serait bénéfique aux patients atteints de mucoviscidose au vu de

l'induction de la réparation épithéliale. Ainsi, une balance complexe entre activation et inhibition de *SLC6A14* semble être nécessaire en fonction du contexte cellulaire, qui mériterait d'être approfondie sur le plan expérimental.

Nous avons ensuite cherché à étudier la régulation de *SLC6A14* dans les contextes inflammatoires et infectieux de la mucoviscidose. En effet, l'analyse des niveaux d'ARNm de *SLC6A14* présents dans des cellules épithéliales nasales de patients mucoviscidosiques et d'individus contrôles ont montré une corrélation positive entre l'âge des patients et l'expression de l'ARNm de *SLC6A14*. Cette corrélation n'est pas retrouvée chez les sujets témoins. Ainsi, nous nous sommes particulièrement interrogés sur l'impact de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β et de la bactérie *P. aeruginosa*, de plus en plus présentes au cours de la vie des patients atteints de mucoviscidose, sur l'expression de *SLC6A14*.

L'IL-1 β est la cytokine pro-inflammatoire majoritaire dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose^{148,381}. Cette cytokine est, entre autres, retrouvée de manière importante dans des maladies inflammatoires coliques telles que la maladie de Crohn³⁸⁸, dans lesquelles une induction de l'expression de *SLC6A14* a été observée^{335,336,364-366}. L'importance de l'IL-1 β dans la physiopathologie de la mucoviscidose a été démontrée notamment vis-à-vis de son impact sur la production de mucines, avec une induction de l'expression des gènes *MUC5B* et *MUC5AC*⁴¹⁶. Cette cytokine a également été retrouvée dans des lavages broncho-alvéolaires d'enfants mucoviscidosiques non infectés, avec des niveaux augmentés en cas d'infections bactériennes⁴¹⁷. Ainsi, nous nous sommes demandés si l'IL-1 β pouvait également influencer l'expression de *SLC6A14*. Nous avons démontré que l'expression et la fonction de *SLC6A14* sont induites en présence d'IL-1 β dans les cellules épithéliales bronchiques. Ces données sont intéressantes sachant que notre groupe et d'autres ont montré que la flagelline de *P. aeruginosa* induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, IL-8 et IL-1 β ³⁸⁵. Par ailleurs, l'IL-1 β joue un rôle important dans la réponse immunitaire innée des cellules épithéliales bronchiques. En effet, Reiniger *et al.* ont montré que l'IL-1 β permet la translocation nucléaire rapide du facteur de transcription NF- κ B, responsable de la réponse immunitaire innée, après infection par *P. aeruginosa*⁴¹⁸. La translocation nucléaire de NF- κ B dépendante de l'IL-1 β est diminuée dans des cellules épithéliales bronchiques CF comparées aux modèles contrôles⁴¹⁸. De plus, l'infection par voie orale de souris déficientes pour le récepteur de l'IL-1 β conduit à une colonisation plus importante des voies aériennes par *P. aeruginosa* et ce, de manière analogue aux souris déficientes pour *Cftr*⁴¹⁸. Ainsi, sachant que l'IL-1 β permet la lutte

contre *P. aeruginosa* en induisant l'expression de différents gènes *via* NF- κ B, la question d'une régulation de *SLC6A14* par ce facteur de transcription se pose.

Des études antérieures ont démontré que la flagelline de *P. aeruginosa* augmente l'expression de l'ARNm de *SLC6A14* et sa fonction d'import d'acides aminés dans les voies aériennes bronchiques^{346,385}. Nous avons pu confirmer ces résultats dans nos lignées cellulaires Calu-3 ainsi que dans des cellules épithéliales bronchiques primaires stimulées par de la flagelline de *P. aeruginosa*. Nous nous attendions alors à observer des niveaux d'expression de *SLC6A14* plus élevés dans les cellules épithéliales bronchiques primaires de patients mucoviscidosiques, généralement infectés par *P. aeruginosa* et/ou ayant un état inflammatoire exacerbé, par rapport aux individus témoins. L'analyse de cellules épithéliales nasales de patients et d'individus témoins a effectivement mis en évidence des niveaux d'ARNm de *SLC6A14* plus importants chez les patients mucoviscidosiques. Nous avons donc voulu comparer les niveaux protéiques de SLC6A14 dans des cellules primaires bronchiques CF et non CF. De manière surprenante, nous avons observé des niveaux protéiques de SLC6A14 plus faibles dans les cellules provenant de patients atteints de mucoviscidose comparés à ceux retrouvés dans les cellules provenant d'individus témoins.

La flagelline joue un rôle majeur dans la réponse inflammatoire induite par *P. aeruginosa* dans les cellules bronchiques CF^{391,392}. Néanmoins, l'utilisation de flagelline isolée ne peut être représentative d'une infection bactérienne, qui implique une multitude de facteurs. En utilisant la bactérie *P. aeruginosa* vivante, nous avons montré que les niveaux protéiques de SLC6A14 étaient diminués après infection par ce pathogène et, plus particulièrement, par l'action de son facteur de virulence LasB. L'élastase LasB de *P. aeruginosa* a précédemment été décrite comme capable de cibler des protéines membranaires, dont CFTR²¹², et nous avons montré pour la première fois que LasB est également capable de cliver SLC6A14. A partir de ces résultats, nous pourrions avancer que l'expression et la fonction de SLC6A14 pourraient être théoriquement équilibrées entre l'effet inducteur de la flagelline sur l'expression du transcrite de *SLC6A14* et le clivage de sa protéine par LasB. Néanmoins, la diminution des niveaux protéiques de SLC6A14 dans le contexte d'une infection par *P. aeruginosa* suggère que l'effet de LasB sur l'expression de la protéine SLC6A14 est plus fort que celui de la flagelline. Ceci s'explique très probablement par l'action directe de LasB sur la flagelline elle-même. En effet, nous avons montré que LasB clive la flagelline, inhibant ainsi l'effet inducteur de la flagelline sur l'expression et la fonction de SLC6A14. L'effet de LasB sur la flagelline de *P. aeruginosa* avait été précédemment démontré dans une autre étude³⁹⁰.

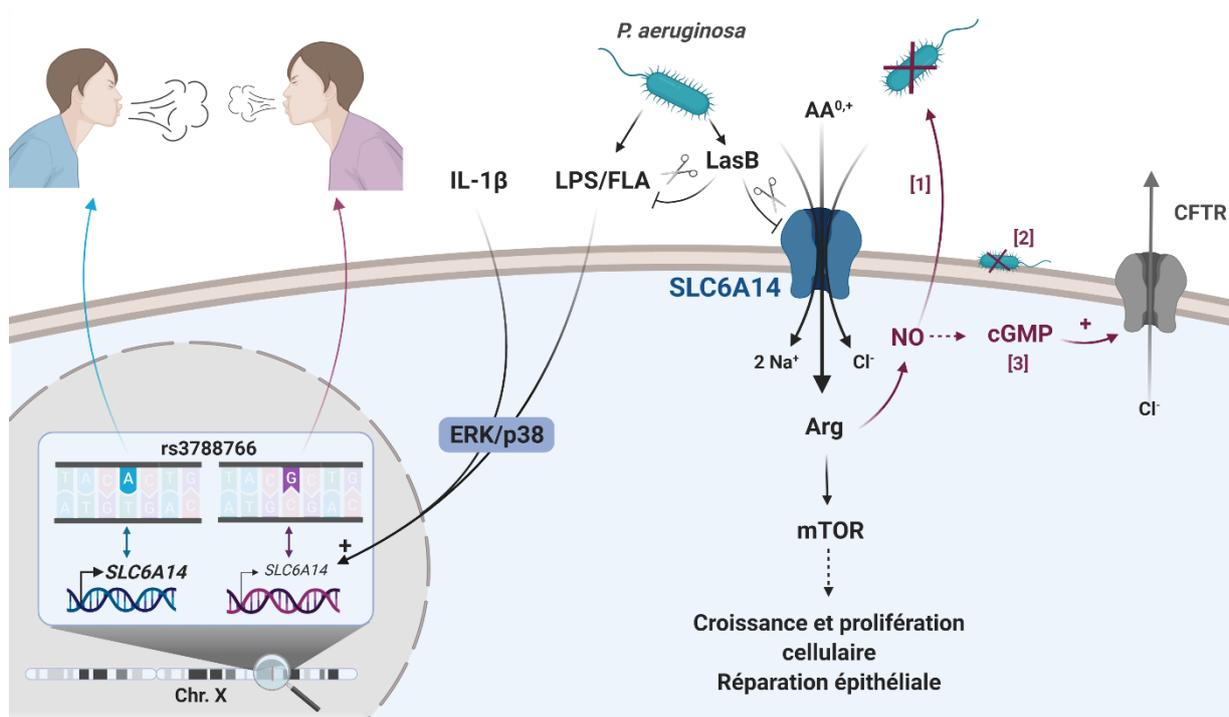
La régulation de l'expression de *SLC6A14* dépendante de l'IL-1 β et de FLA semble dépendre de la signalisation p38/ERK. Par ailleurs, d'autres études récentes ont montré l'implication de la voie Jak/Stat dans la régulation de l'expression de *SLC6A14*^{346,353}.

Ainsi, *SLC6A14* semble être un acteur important dans la physiopathologie de la mucoviscidose. En effet, ce transporteur d'acides aminés cationiques et neutres pourrait favoriser la lutte contre la colonisation par *P. aeruginosa* comme décrit par Di Paola *et al.*³⁴⁶. D'une part, l'absorption d'arginine dépendante de *SLC6A14* pourrait permettre une privation des acides aminés essentiels aux bactéries auxotrophes présentes dans le liquide de surface des voies aériennes, conduisant à une diminution de la survie de *P. aeruginosa* ou de son attachement à la surface de l'épithélium bronchique³⁴⁶. En effet, l'inhibition de *SLC6A14* ou l'absence de *Slc6a14* semblent induire une augmentation de l'adhérence de *P. aeruginosa* à la surface des cellules épithéliales bronchiques primaires humaines et du tissu pulmonaire de souris *Slc6a14*^{y/-}, respectivement³⁴⁶. Il serait intéressant de réitérer ces expériences d'adhérence bactérienne sur des explants pulmonaires humains. Nous projetons également d'étudier la prolifération bactérienne dans le milieu de culture apical de cellules épithéliales primaires cultivées en interface air-liquide, traitées ou non avec le l' α -MT, ou transfectées avec un siARN-*SLC6A14* et ce, avec les souches PAO1 WT et PAO1 Δ LasB. D'autre part, l'import d'arginine dépendant de *SLC6A14* permettrait une augmentation des concentrations intracellulaires de cet acide aminé, connu pour être métabolisé en monoxyde d'azote (NO), ayant un effet bactéricide^{393,394}. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que les cellules épithéliales bronchiques répondent à l'infection et à l'inflammation en régulant à la hausse l'expression de *SLC6A14*, suite à la détection d'IL-1 β et/ou de flagelline par les cellules hôtes. De manière intéressante, nous avons également observé l'induction de l'expression en ARNm de *SLC6A14* après stimulation par la flagelline de la bactérie *Salmonella Typhimurium*, suggérant une réponse de l'épithélium à plusieurs types de pathogènes. Par ailleurs, l'élastase LasB sécrétée par *P. aeruginosa* induit le clivage de *SLC6A14*, ainsi que la dégradation de la flagelline, ce qui pourrait empêcher la détection de *P. aeruginosa* et la synthèse *de novo* de *SLC6A14*. Par conséquent, LasB reste une cible thérapeutique prometteuse, en raison de son action directe sur CFTR²¹² mais aussi sur *SLC6A14*, qui a été démontré comme pouvant favoriser la fonction de CFTR *via* la voie de signalisation du NO³³⁸. Le rôle de *SLC6A14* dans la physiopathologie de la mucoviscidose commence donc à être élucidé, mais les études mécanistiques et fonctionnelles concernant la biosynthèse de NO dépendant de *SLC6A14* ou la prolifération bactérienne doivent être approfondies. Ainsi, une des futures pistes de recherche concernant ce

projet consisterait à mesurer les concentrations intra- et extra-cellulaires de NO lors de diverses stimulations (IL-1 β , FLA, LasB, *P. aeruginosa*...) en contexte d'inhibition/sous-expression de SLC6A14 (α -MT, siARN) ou au contraire de surexpression (*via* un vecteur plasmidique), qui nécessiterait l'utilisation d'un modèle cellulaire exprimant peu *SLC6A14*, tel que les lignées cellulaires bronchiques 16-HBE et 16-HBE Δ F508, pour des modèles non CF et CF, respectivement.

Pour finir, nous avons réalisé une analyse du transcriptome et du protéome sur des cellules épithéliales bronchiques primaires CF différenciées, traitées ou non avec de l' α -MT pendant 1 h, 6 h ou 24 h. Les résultats du protéome ne nous sont pas encore parvenus à ce jour et l'analyse du transcriptome est toujours en cours. Les premières analyses (Cf **Annexe 2**) nous confirment que lors d'une inhibition de la fonction de SLC6A14, nous observons une diminution des voies de régulation du cycle cellulaire, en parallèle d'une induction de la voie p38-MAPK et de l'autophagie. De manière intéressante, SLC6A14 semble également agir sur la voie de l'IL-17, impliquée dans la protection anti-bactérienne des muqueuses pulmonaires⁴¹⁹.

Nous avons ainsi pu étoffer la compréhension du rôle de SLC6A14 dans la physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose, qui pourrait éventuellement permettre à long terme la mise en place d'une médecine personnalisée. En effet, nous pouvons imaginer le développement d'un génotypage systématique des patients atteints de mucoviscidose permettant d'identifier les variants de *SLC6A14*, ainsi que d'autres gènes modificateurs de la mucoviscidose. Cette caractérisation pourrait permettre de prédire un risque plus élevé d'infection précoce à *P. aeruginosa* et d'adapter le suivi et les traitements des patients en conséquence. Nos résultats nous amènent à penser qu'une augmentation de l'expression de SLC6A14 chez les patients atteints de mucoviscidose leur permettrait une meilleure réponse anti-infectieuse. Ainsi, induire l'expression de SLC6A14 ou empêcher sa dégradation leur serait bénéfique. Afin d'empêcher la dégradation de SLC6A14, LasB semble donc être une cible thérapeutique intéressante de par son effet sur SLC6A14 mais également sur ses autres nombreux substrats, ayant des effets délétères sur les tissus de l'hôte, ses processus inflammatoires et réponses immunitaires²⁰⁷.



[1] DiPaola et al., *mBio*, 2017; [2] Hibbard and Reynolds, *J Mater Chem B*, 2019; [3] Ahmadi et al., *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019 ;
 [4] Casilag et al., *Infect Immun*, 2016

Figure 30. Schéma bilan récapitulant les résultats obtenus et autres pistes d'étude. Représentation des liens entre le phénotype respiratoire, le polymorphisme de SLC6A14, sa régulation en conditions inflammatoires et infectieuses de la mucoviscidose, son impact sur la voie de signalisation mTOR et la réparation épithéliale. Figurent en violet les autres interactions décrites dans la littérature et perspectives de recherche.

Références bibliographiques

1. Brune, K., Frank, J., Schwingshackl, A., Finigan, J. & Sidhaye, V. K. Pulmonary epithelial barrier function: some new players and mechanisms. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **308**, L731–L745 (2015).
2. Antunes, M. A., Morales, M. M., Pelosi, P. & Rocco, P. R. M. Lung Resident Stem Cells. in *Resident Stem Cells and Regenerative Therapy* 105–122 (2013).
3. Davis, J. D. & Wypych, T. P. Cellular and functional heterogeneity of the airway epithelium. *Mucosal Immunol.* (2021).
4. Travaglini, K. J. *et al.* A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature* **587**, 619–625 (2020).
5. Bérubé, K., Prytherch, Z., Job, C. & Hughes, T. Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models. *Toxicology* **278**, 311–318 (2010).
6. Gibson, J. in *Respiratory Medicine* (Elsevier Science Ltd, 2002).
7. Jeffery, P. K. & Li, D. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur. Respir. J.* **10**, 1655–1662 (1997).
8. Moran, R. in *Visual Histology* (Philadelphia: Lea & Febiger, 1988).
9. Ross, P. in *Histology* (Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006).
10. Crystal, R. G. Airway basal cells. The ‘smoking gun’ of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **190**, 1355–1362 (2014).
11. Boers, J. E., Ambergen, A. W. & Thunnissen, F. B. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 2000–2006 (1998).
12. Rock, J. R., Randell, S. H. & Hogan, B. L. M. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis. Model. Mech.* **3**, 545–556 (2010).

13. Montoro, D. T. *et al.* A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* **560**, 319–324 (2018).
14. Hong, K. U., Reynolds, S. D., Watkins, S., Fuchs, E. & Stripp, B. R. *In vivo* differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **286**, L643–649 (2004).
15. Ghosh, M. *et al.* A single cell functions as a tissue-specific stem cell and the *in vitro* niche-forming cell. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **45**, 459–469 (2011).
16. Watson, J. K. *et al.* Clonal Dynamics Reveal Two Distinct Populations of Basal Cells in Slow-Turnover Airway Epithelium. *Cell Rep.* **12**, 90–101 (2015).
17. Boers, J. E., Ambergen, A. W. & Thunnissen, F. B. Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 1585–1591 (1999).
18. Hong, K. U., Reynolds, S. D., Giangreco, A., Hurley, C. M. & Stripp, B. R. Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**, 671–681 (2001).
19. Basil, M. C. *et al.* The Cellular and Physiological Basis for Lung Repair and Regeneration: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell* **26**, 482–502 (2020).
20. Tata, P. R. *et al.* Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells *in vivo*. *Nature* **503**, 218–223 (2013).
21. Rawlins, E. L. *et al.* The role of Scgb1a1⁺ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell Stem Cell* **4**, 525–534 (2009).
22. Guo, M. *et al.* Single cell RNA analysis identifies cellular heterogeneity and adaptive responses of the lung at birth. *Nat. Commun.* **10**, 37 (2019).

23. Saglani, S. *et al.* Update in Asthma 2019. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **202**, 184–192 (2020).
24. Ruiz García, S. *et al.* Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures. *Dev. Camb. Engl.* **146**, dev177428 (2019).
25. Bustamante-Marin, X. M. & Ostrowski, L. E. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a028241 (2017).
26. Whitsett, J. A. Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **15**, S143–S148 (2018).
27. Bergström, J. H. *et al.* Gram-positive bacteria are held at a distance in the colon mucus by the lectin-like protein ZG16. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 13833–13838 (2016).
28. Vieira Braga, F. A. *et al.* A cellular census of human lungs identifies novel cell states in health and in asthma. *Nat. Med.* **25**, 1153–1163 (2019).
29. Evans, C. M. *et al.* The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity. *Nat. Commun.* **6**, 6281 (2015).
30. Roy, M. G. *et al.* Muc5b is required for airway defence. *Nature* **505**, 412–416 (2014).
31. Van Lommel, A. Pulmonary neuroendocrine cells (PNEC) and neuroepithelial bodies (NEB): chemoreceptors and regulators of lung development. *Paediatr. Respir. Rev.* **2**, 171–176 (2001).
32. Garg, A., Sui, P., Verheyden, J. M., Young, L. R. & Sun, X. Consider the lung as a sensory organ: A tip from pulmonary neuroendocrine cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* **132**, 67–89 (2019).
33. Branchfield, K. *et al.* Pulmonary neuroendocrine cells function as airway sensors to control lung immune response. *Science* **351**, 707–710 (2016).

34. Cutz, E., Pan, J., Yeger, H., Domnik, N. J. & Fisher, J. T. Recent advances and controversies on the role of pulmonary neuroepithelial bodies as airway sensors. *Semin. Cell Dev. Biol.* **24**, 40–50 (2013).
35. Boers, J. E., den Brok, J. L., Koudstaal, J., Arends, J. W. & Thunnissen, F. B. Number and proliferation of neuroendocrine cells in normal human airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 758–763 (1996).
36. Reynolds, S. D., Giangreco, A., Power, J. H. & Stripp, B. R. Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am. J. Pathol.* **156**, 269–278 (2000).
37. Cutz, E., Yeger, H. & Pan, J. Pulmonary neuroendocrine cell system in pediatric lung disease-recent advances. *Pediatr. Dev. Pathol. Off. J. Soc. Pediatr. Pathol. Paediatr. Pathol. Soc.* **10**, 419–435 (2007).
38. Goldfarbmuren, K. C. *et al.* Dissecting the cellular specificity of smoking effects and reconstructing lineages in the human airway epithelium. *Nat. Commun.* **11**, 2485 (2020).
39. Ouadah, Y. *et al.* Rare Pulmonary Neuroendocrine Cells Are Stem Cells Regulated by Rb, p53, and Notch. *Cell* **179**, 403-416.e23 (2019).
40. Song, H. *et al.* Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 17531–17536 (2012).
41. Gu, X. *et al.* Chemosensory functions for pulmonary neuroendocrine cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **50**, 637–646 (2014).
42. Bezençon, C. *et al.* Murine intestinal cells expressing Trpm5 are mostly brush cells and express markers of neuronal and inflammatory cells. *J. Comp. Neurol.* **509**, 514–525 (2008).

43. Höfer, D., Püschel, B. & Drenckhahn, D. Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6631–6634 (1996).
44. Fletcher, R. B. *et al.* Deconstructing Olfactory Stem Cell Trajectories at Single-Cell Resolution. *Cell Stem Cell* **20**, 817–830.e8 (2017).
45. Krasteva, G. *et al.* Cholinergic chemosensory cells in the auditory tube. *Histochem. Cell Biol.* **137**, 483–497 (2012).
46. Wiederhold, S. *et al.* A novel cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in the murine conjunctiva. *Int. Immunopharmacol.* **29**, 45–50 (2015).
47. Luciano, L., Castellucci, M. & Reale, E. The brush cells of the common bile duct of the rat. This section, freeze-fracture and scanning electron microscopy. *Cell Tissue Res.* **218**, 403–420 (1981).
48. Luciano, L. & Reale, E. Presence of brush cells in the mouse gallbladder. *Microsc. Res. Tech.* **38**, 598–608 (1997).
49. Nevalainen, T. J. Ultrastructural characteristics of tuft cells in mouse gallbladder epithelium. *Acta Anat. (Basel)* **98**, 210–220 (1977).
50. Deckmann, K. *et al.* Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 8287–8292 (2014).
51. Deckmann, K. & Kummer, W. Chemosensory epithelial cells in the urethra: sentinels of the urinary tract. *Histochem. Cell Biol.* **146**, 673–683 (2016).
52. Bornstein, C. *et al.* Single-cell mapping of the thymic stroma identifies IL-25-producing tuft epithelial cells. *Nature* **559**, 622–626 (2018).
53. Morroni, M., Cangioti, A. M. & Cinti, S. Brush cells in the human duodenojejunal junction: an ultrastructural study. *J. Anat.* **211**, 125–131 (2007).

54. O’Leary, C. E., Schneider, C. & Locksley, R. M. Tuft Cells-Systemically Dispersed Sensory Epithelia Integrating Immune and Neural Circuitry. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 47–72 (2019).
55. Barham, H. P. *et al.* Solitary chemosensory cells and bitter taste receptor signaling in human sinonasal mucosa. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **3**, 450–457 (2013).
56. Sharma, P. *et al.* Bitter Taste Receptor Agonists Mitigate Features of Allergic Asthma in Mice. *Sci. Rep.* **7**, 46166 (2017).
57. Rane, C. K. *et al.* Development of solitary chemosensory cells in the distal lung after severe influenza injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **316**, L1141–L1149 (2019).
58. Deprez, M. *et al.* A Single-Cell Atlas of the Human Healthy Airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **202**, 1636–1645 (2020).
59. Kimura, S. Molecular insights into the mechanisms of M-cell differentiation and transcytosis in the mucosa-associated lymphoid tissues. *Anat. Sci. Int.* **93**, 23–34 (2018).
60. Fujimura, Y. Evidence of M cells as portals of entry for antigens in the nasopharyngeal lymphoid tissue of humans. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **436**, 560–566 (2000).
61. Kim, D.-Y. *et al.* The airway antigen sampling system: respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 4253–4262 (2011).
62. Nair, V. R. *et al.* Microfold Cells Actively Translocate Mycobacterium tuberculosis to Initiate Infection. *Cell Rep.* **16**, 1253–1258 (2016).
63. Meyrick, B., Sturgess, J. M. & Reid, L. A reconstruction of the duct system and secretory tubules of the human bronchial submucosal gland. *Thorax* **24**, 729–736 (1969).
64. Meyrick, B. & Reid, L. Ultrastructure of cells in the human bronchial submucosal glands. *J. Anat.* **107**, 281–299 (1970).

65. Widdicombe, J. H. & Wine, J. J. Airway Gland Structure and Function. *Physiol. Rev.* **95**, 1241–1319 (2015).
66. Lee, R. J., Limberis, M. P., Hennessy, M. F., Wilson, J. M. & Foskett, J. K. Optical imaging of Ca^{2+} -evoked fluid secretion by murine nasal submucosal gland serous acinar cells. *J. Physiol.* **582**, 1099–1124 (2007).
67. Hinnrasky, J., Chevillard, M. & Puchelle, E. Immunocytochemical demonstration of quantitative differences in the distribution of lysozyme in human airway secretory granule phenotypes. *Biol. Cell* **68**, 239–243 (1990).
68. Bowes, D. & Corrin, B. Ultrastructural immunocytochemical localisation of lysozyme in human bronchial glands. *Thorax* **32**, 163–170 (1977).
69. Bowes, D., Clark, A. E. & Corrin, B. Ultrastructural localisation of lactoferrin and glycoprotein in human bronchial glands. *Thorax* **36**, 108–115 (1981).
70. Basbaum, C. B., Jany, B. & Finkbeiner, W. E. The serous cell. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 97–113 (1990).
71. Mason, R. J. Biology of alveolar type II cells. *Respirol. Carlton Vic* **11 Suppl**, S12-15 (2006).
72. Guillot, L. *et al.* Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 2568–2573 (2013).
73. Plasschaert, L. W. *et al.* A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* **560**, 377–381 (2018).
74. Quigley, I. K., Stubbs, J. L. & Kintner, C. Specification of ion transport cells in the *Xenopus* larval skin. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 705–714 (2011).
75. Esaki, M. *et al.* Mechanism of development of ionocytes rich in vacuolar-type H^{+} -ATPase in the skin of zebrafish larvae. *Dev. Biol.* **329**, 116–129 (2009).

76. Travaglini, K. J. & Krasnow, M. A. Profile of an unknown airway cell. *Nature* **560**, 313–314 (2018).
77. Knowles, M. R. & Boucher, R. C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* **109**, 571–577 (2002).
78. Fahy, J. V. & Dickey, B. F. Airway Mucus Function and Dysfunction. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2233–2247 (2010).
79. Boyton, R. J. & Openshaw, P. J. Pulmonary defences to acute respiratory infection. *Br. Med. Bull.* **61**, 1–12 (2002).
80. Kapetanovic, R. & Cavallion, J.-M. Early events in innate immunity in the recognition of microbial pathogens. *Expert Opin. Biol. Ther.* **7**, 907–918 (2007).
81. Nakamura, H., Yoshimura, K., McElvaney, N. G. & Crystal, R. G. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J. Clin. Invest.* **89**, 1478–1484 (1992).
82. Singh, P. K. *et al.* Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14961–14966 (1998).
83. Harder, J. *et al.* Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL-1 β , but not IL-6, induce human β -defensin-2 in respiratory epithelia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**, 714–721 (2000).
84. Mekus, F. *et al.* Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. *Twin Res. Off. J. Int. Soc. Twin Stud.* **3**, 277–293 (2000).
85. Lopes-Pacheco, M. CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Front. Pharmacol.* **7**, 275 (2016).

86. Kerem, B. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**, 1073–1080 (1989).
87. Riordan, J. R. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066–1073 (1989).
88. Rommens, J. M. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**, 1059–1065 (1989).
89. Voynow, J. A. & Scanlin, T. F. Cystic Fibrosis - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www-sciencedirect-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/topics/medicine-and-dentistry/cystic-fibrosis> (2005).
90. Ogino, S., Gulley, M. L., den Dunnen, J. T. & Wilson, R. B. Standard Mutation Nomenclature in Molecular Diagnostics. *J. Mol. Diagn. JMD* **9**, 1–6 (2007).
91. Amaral, M. D. & Farinha, C. M. Rescuing mutant CFTR: a multi-task approach to a better outcome in treating cystic fibrosis. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 3497–3508 (2013).
92. Quon, B. S. & Rowe, S. M. New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis. *BMJ* **352**, i859 (2016).
93. Veit, G. *et al.* From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol. Biol. Cell* **27**, 424–433 (2016).
94. Bareil, C. & Bergougnoux, A. CFTR gene variants, epidemiology and molecular pathology. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr.* **27 Suppl 1**, eS8–eS12 (2020).
95. Boyle, M. P. & De Boeck, K. A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Respir. Med.* **1**, 158–163 (2013).
96. Farriaux, J. P., Vidailhet, M., Briard, M. L., Belot, V. & Dhondt, J. L. Neonatal screening for cystic fibrosis: France rises to the challenge. *J. Inherit. Metab. Dis.* **26**, 729–744 (2003).

97. Di Sant'agnese, P. A., Darling, R. C., Perera, G. A. & Shea, E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* **12**, 549–563 (1953).
98. Gibson, L. E. & Cooke, R. E. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* **23**, 545–549 (1959).
99. Sabharwal, S. Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis. *Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 43–47 (2016).
100. Mouterde, O. Manifestations digestives et nutritionnelles de la mucoviscidose. *Rev. Francoph. Lab.* **397**, (2007).
101. Gelfond, D. & Borowitz, D. Gastrointestinal complications of cystic fibrosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **11**, 333–342; quiz e30-31 (2013).
102. Kessler, L. & Abély, M. [Pancreatic infringement exocrine and endocrine in cystic fibrosis]. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr.* **23**, 12S21-12S32 (2016).
103. Dodge, J. A. & Turck, D. Cystic fibrosis: nutritional consequences and management. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **20**, 531–546 (2006).
104. Ledder, O., Haller, W., Couper, R. T., Lewindon, P. & Oliver, M. Cystic fibrosis: an update for clinicians. Part 2: hepatobiliary and pancreatic manifestations. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **29**, 1954–1962 (2014).
105. Ripa, P. *et al.* The relationship between insulin secretion, the insulin-like growth factor axis and growth in children with cystic fibrosis. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **56**, 383–389 (2002).
106. Kelly, A. & Moran, A. Update on cystic fibrosis-related diabetes. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **12**, 318–331 (2013).

107. Debray, D. [Cystic fibrosis associated with liver disease]. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr.* **19 Suppl 1**, S23-26 (2012).
108. Boëlle, P.-Y. *et al.* Cystic Fibrosis Liver Disease: Outcomes and Risk Factors in a Large Cohort of French Patients. *Hepatology*. **69**, 1648–1656 (2019).
109. Regard, L., Lafoeste, H., Martin, C., Chassagnon, G. & Burgel, P.-R. [Ageing with cystic fibrosis: Classical and emerging comorbidities in adults with cystic fibrosis]. *Rev. Pneumol. Clin.* **74**, 279–291 (2018).
110. Kotloff, R. M., FitzSimmons, S. C. & Fiel, S. B. Fertility and pregnancy in patients with cystic fibrosis. *Clin. Chest Med.* **13**, 623–635 (1992).
111. Wong, P. Y. CFTR gene and male fertility. *Mol. Hum. Reprod.* **4**, 107–110 (1998).
112. Shead, E. F. *et al.* Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone. *Thorax* **62**, 650–651 (2007).
113. Le Heron, L. *et al.* Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) regulates the production of osteoprotegerin (OPG) and prostaglandin (PG) E2 in human bone. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **9**, 69–72 (2010).
114. Sermet-Gaudelus, I. *et al.* Low bone mineral density in young children with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 951–957 (2007).
115. Jacquot, J., Delion, M., Gangloff, S., Braux, J. & Velard, F. Bone disease in cystic fibrosis: new pathogenic insights opening novel therapies. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* **27**, 1401–1412 (2016).
116. Velard, F. *et al.* Overexpression of RANK and M-CSFR in Monocytes of G551D-Bearing Patients with Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **198**, 968–970 (2018).
117. Shead, E. F., Haworth, C. S., Barker, H., Bilton, D. & Compston, J. E. Osteoclast function, bone turnover and inflammatory cytokines during infective exacerbations of cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **9**, 93–98 (2010).

118. Ferguson, J. H. & Chang, A. B. Vitamin D supplementation for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD007298 (2014).
119. Nazareth, D. & Walshaw, M. A review of renal disease in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **12**, 309–317 (2013).
120. Bar-Or, O. *et al.* Voluntary dehydration and heat intolerance in cystic fibrosis. *Lancet Lond. Engl.* **339**, 696–699 (1992).
121. Bar-Or, O., Dotan, R., Inbar, O., Rotshtein, A. & Zonder, H. Voluntary hypohydration in 10- to 12-year-old boys. *J. Appl. Physiol.* **48**, 104–108 (1980).
122. Rothstein, A., Adolph, E. F. & Wills, J. H. Voluntary dehydration. in *Physiology of Man in the Desert* 254–270 (1947).
123. Mohd Slim, M. A., Dick, D., Trimble, K. & McKee, G. Paediatric nasal polyps in cystic fibrosis. *BMJ Case Rep.* **2016**, (2016).
124. Weber, S. A. T., Iyomasa, R. M., Corrêa, C. de C., Florentino, W. N. M. & Ferrari, G. F. Nasal polyposis in cystic fibrosis: follow-up of children and adolescents for a 3-year period. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **83**, 677–682 (2017).
125. Quittner, A. L. *et al.* Prevalence of depression and anxiety in patients with cystic fibrosis and parent caregivers: results of The International Depression Epidemiological Study across nine countries. *Thorax* **69**, 1090–1097 (2014).
126. Baiardini, I., Steinhilber, G., DI Marco, F., Braidò, F. & Solidoro, P. Anxiety and depression in cystic fibrosis. *Minerva Med.* **106**, 1–8 (2015).
127. Havermans, T. & Willem, L. Prevention of anxiety and depression in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **25**, 654–659 (2019).
128. Neglia, J. P. *et al.* The risk of cancer among patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis and Cancer Study Group. *N. Engl. J. Med.* **332**, 494–499 (1995).

129. Maisonneuve, P., Marshall, B. C., Knapp, E. A. & Lowenfels, A. B. Cancer risk in cystic fibrosis: a 20-year nationwide study from the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 122–129 (2013).
130. Maisonneuve, P., Marshall, B. C. & Lowenfels, A. B. Risk of pancreatic cancer in patients with cystic fibrosis. *Gut* **56**, 1327–1328 (2007).
131. Elborn, J. S. Cystic fibrosis. *Lancet Lond. Engl.* **388**, 2519–2531 (2016).
132. Kerem, E., Reisman, J., Corey, M., Canny, G. J. & Levison, H. Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **326**, 1187–1191 (1992).
133. Zhao, J., Cheng, W., He, X. & Liu, Y. The co-colonization prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *Microb. Pathog.* **125**, 122–128 (2018).
134. Brandt, C. *et al.* Aspergillus Bronchitis in Patients with Cystic Fibrosis. *Mycopathologia* **183**, 61–69 (2018).
135. Blanchard, A. C. & Waters, V. J. Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **40**, 727–736 (2019).
136. Amaral, M. D. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *J. Intern. Med.* **277**, 155–166 (2015).
137. van Horck, M. *et al.* Risk factors for lung disease progression in children with cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* **51**, 1702509 (2018).
138. Khan, T. Z. *et al.* Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, 1075–1082 (1995).
139. Konstan, M. W., Hilliard, K. A., Norvell, T. M. & Berger, M. Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**, 448–454 (1994).

140. Shanthikumar, S., Ranganathan, S. C., Saffery, R. & Neeland, M. R. Mapping Pulmonary and Systemic Inflammation in Preschool Aged Children With Cystic Fibrosis. *Front. Immunol.* **12**, 733217 (2021).
141. Strateva, T. & Mitov, I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann. Microbiol.* **2011** 61 4 717-732 (2011).
142. Folkesson, A. *et al.* Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 841–851 (2012).
143. Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W. & Prince, A. S. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **171**, 1209–1223 (2005).
144. McGreal, E. P. *et al.* Inactivation of IL-6 and soluble IL-6 receptor by neutrophil derived serine proteases in cystic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 649–658 (2010).
145. 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).
146. 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).
147. Rosenfeld, M. *et al.* Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **32**, 356–366 (2001).
148. Bonfield, T. L. *et al.* Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**, 2111–2118 (1995).
149. Noah, T. L., Black, H. R., Cheng, P. W., Wood, R. E. & Leigh, M. W. Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **175**, 638–647 (1997).

150. Sagel, S. D., Chmiel, J. F. & Konstan, M. W. Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **4**, 406–417 (2007).
151. Majka, G. *et al.* Chronic bacterial pulmonary infections in advanced cystic fibrosis differently affect the level of sputum neutrophil elastase, IL-8 and IL-6. *Clin. Exp. Immunol.* **205**, 391–405 (2021).
152. Pier, G. B. & Ramphal, R. *Pseudomonas aeruginosa*. in *Principles and Practice of Infectious Disease* 2587–2615 (6th Edition, Churchill Livingstone, New York, 2005).
153. Lin, C. K. & Kazmierczak, B. I. Inflammation: A Double-Edged Sword in the Response to *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *J. Innate Immun.* **9**, 250–261 (2017).
154. Mayer-Hamblett, N. *et al.* Association between pulmonary function and sputum biomarkers in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 822–828 (2007).
155. Armstrong, D. S. *et al.* Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, 1197–1204 (1997).
156. Birrer, P. Proteases and antiproteases in cystic fibrosis: pathogenetic considerations and therapeutic strategies. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* **62 Suppl 1**, 25–28 (1995).
157. Birrer, P. *et al.* Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**, 207–213 (1994).
158. Goldstein, W. & Döring, G. Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **134**, 49–56 (1986).
159. Chignard, M. & Pidard, D. Neutrophil and pathogen proteinases versus proteinase-activated receptor-2 lung epithelial cells: more terminators than activators. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**, 394–398 (2006).

160. Chertov, O. *et al.* Identification of Human Neutrophil-derived Cathepsin G and Azurocidin/CAP37 as Chemoattractants for Mononuclear Cells and Neutrophils. *J. Exp. Med.* **186**, 739–747 (1997).
161. Ehre, C. Accumulation de mucus - Le point de départ de la pathogénèse pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose. *médecine/sciences* **35**, 1217–1220 (2019).
162. Vandivier, R. W. *et al.* Impaired clearance of apoptotic cells from cystic fibrosis airways. *Chest* **121**, 89S (2002).
163. Voynow, J. A., Fischer, B. M. & Zheng, S. Proteases and Cystic Fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1238–1245 (2008).
164. Fuchs, H. J. *et al.* Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N. Engl. J. Med.* **331**, 637–642 (1994).
165. Shak, S., Capon, D. J., Hellmiss, R., Marsters, S. A. & Baker, C. L. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 9188–9192 (1990).
166. Rose, M. C. & Voynow, J. A. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol. Rev.* **86**, 245–278 (2006).
167. Matsui, H. *et al.* A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18131–18136 (2006).
168. Matsui, H. *et al.* Reduced three-dimensional motility in dehydrated airway mucus prevents neutrophil capture and killing bacteria on airway epithelial surfaces. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 1090–1099 (2005).
169. 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).

170. Gangell, C. *et al.* Inflammatory responses to individual microorganisms in the lungs of children with cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **53**, 425–432 (2011).
171. Balough, K. *et al.* The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **20**, 63–70 (1995).
172. Bragonzi, A. *et al.* Inflammation and host-pathogen interaction: Cause and consequence in cystic fibrosis lung disease. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **17**, S40–S45 (2018).
173. Faure, E., Kwong, K. & Nguyen, D. *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Lung Infections: How to Adapt Within the Host? *Front. Immunol.* **9**, 2416 (2018).
174. Rosenthal, V. D. *et al.* Six-year multicenter study on short-term peripheral venous catheters-related bloodstream infection rates in 727 intensive care units of 268 hospitals in 141 cities of 42 countries of Africa, the Americas, Eastern Mediterranean, Europe, South East Asia, and Western Pacific Regions: International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) findings. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **41**, 553–563 (2020).
175. Taylor, P. K., Yeung, A. T. Y. & Hancock, R. E. W. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *J. Biotechnol.* **191**, 121–130 (2014).
176. Guillon, A. *et al.* Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Present in Endotracheal Tubes by Poly-l-Lysine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e00564-18 (2018).
177. King, J. D., Kocíncová, D., Westman, E. L. & Lam, J. S. Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun.* **15**, 261–312 (2009).
178. de Lorenzo, V. *Pseudomonas aeruginosa*: the making of a pathogen. *Environ. Microbiol.* **17**, 1–3 (2015).

179. Bhagirath, A. Y. *et al.* Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm. Med.* **16**, 174 (2016).
180. Waters, C. M. & Goldberg, J. B. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: A chronic cheater. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 6525–6527 (2019).
181. Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**, 269–275 (1994).
182. Ruimy, R. & Andremont, A. Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition. *Réanimation* **13**, 176–184 (2004).
183. Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J. & Salmond, G. P. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 365–404 (2001).
184. Gambello, M. J., Kaye, S. & Iglewski, B. H. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect. Immun.* **61**, 1180–1184 (1993).
185. Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J. Bacteriol.* **173**, 3000–3009 (1991).
186. Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L. & Iglewski, B. H. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260**, 1127–1130 (1993).
187. Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H. & Greenberg, E. P. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 1490–1494 (1995).
188. Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A. & Hamood, A. N. The role of quorum sensing in the *in vivo* virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect.* **2**, 1721–1731 (2000).

189. Toder, D. S., Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. *Mol. Microbiol.* **5**, 2003–2010 (1991).
190. Seed, P. C., Passador, L. & Iglewski, B. H. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J. Bacteriol.* **177**, 654–659 (1995).
191. Ochsner, U. A., Koch, A. K., Fiechter, A. & Reiser, J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **176**, 2044–2054 (1994).
192. Latifi, A. *et al.* Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* **17**, 333–343 (1995).
193. Bever, R. A. & Iglewski, B. H. Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase structural gene. *J. Bacteriol.* **170**, 4309–4314 (1988).
194. Nagano, T. *et al.* Stimulatory effect of pseudomonal elastase on collagen degradation by cultured keratocytes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 1247–1253 (2001).
195. Yang, J. *et al.* Mechanistic Insights into Elastin Degradation by Pseudolysin, the Major Virulence Factor of the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
196. Dulon, S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* elastase disables proteinase-activated receptor 2 in respiratory epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **32**, 411–419 (2005).
197. Ossovskaya, V. S. & Bunnett, N. W. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol. Rev.* **84**, 579–621 (2004).
198. Cocks, T. M. *et al.* A protective role for protease-activated receptors in the airways. *Nature* **398**, 156–160 (1999).

199. Vancheri, C., Mastruzzo, C., Sortino, M. A. & Crimi, N. The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE₂. *Trends Immunol.* **25**, 40–46 (2004).
200. Vliagoftis, H. *et al.* Proteinase-activated receptor-2-mediated matrix metalloproteinase-9 release from airway epithelial cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106**, 537–545 (2000).
201. Sun, G., Stacey, M. A., Schmidt, M., Mori, L. & Mattoli, S. Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 1014–1021 (2001).
202. Vliagoftis, H., Befus, A. D., Hollenberg, M. D. & Moqbel, R. Airway epithelial cells release eosinophil survival-promoting factors (GM-CSF) after stimulation of proteinase-activated receptor 2. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 679–685 (2001).
203. Asokanathan, N. *et al.* Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E₂ release from human respiratory epithelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **168**, 3577–3585 (2002).
204. Döring, G. *et al.* Proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **147**, 744–750 (1983).
205. Buret, A. & Cripps, A. W. The immunoevasive activities of *Pseudomonas aeruginosa*. Relevance for cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**, 793–805 (1993).
206. Holder, I. A. & Wheeler, R. Experimental studies of the pathogenesis of infections owing to *Pseudomonas aeruginosa*: elastase, an IgG protease. *Can. J. Microbiol.* **30**, 1118–1124 (1984).
207. Everett, M. J. & Davies, D. T. *Pseudomonas aeruginosa* elastase (LasB) as a therapeutic target. *Drug Discov. Today* **26**, 2108–2123 (2021).
208. Ma, L. *et al.* Manipulation of the silkworm immune system by a metalloprotease from the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev. Comp. Immunol.* **90**, 176–185 (2019).

209. Casilag, F. *et al.* The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. *Infect. Immun.* **84**, 162–171 (2015).
210. Yu, H. *et al.* Elastase LasB of *Pseudomonas aeruginosa* promotes biofilm formation partly through rhamnolipid-mediated regulation. *Can. J. Microbiol.* **60**, 227–235 (2014).
211. Kamath, S., Kapatral, V. & Chakrabarty, A. M. Cellular function of elastase in *Pseudomonas aeruginosa*: role in the cleavage of nucleoside diphosphate kinase and in alginate synthesis. *Mol. Microbiol.* **30**, 933–941 (1998).
212. Saint-Criq, V. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator-IL-6-antimicrobial-repair pathway. *Thorax* **73**, 49–61 (2018).
213. Azghani, A. O., Baker, J. W., Shetty, S., Miller, E. J. & Bhat, G. J. *Pseudomonas aeruginosa* elastase stimulates ERK signaling pathway and enhances IL-8 production by alveolar epithelial cells in culture. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* **51**, 506–510 (2002).
214. Le Gars, M. *et al.* Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function *in vitro* and *in vivo*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 170–179 (2013).
215. Cathcart, G. R. A. *et al.* Novel inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor LasB: a potential therapeutic approach for the attenuation of virulence mechanisms in pseudomonal infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 2670–2678 (2011).
216. Pier, G. B. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **297**, 277–295 (2007).

217. Huszczyński, S. M., Lam, J. S. & Khursigara, C. M. The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathog. Basel Switz.* **9**, (2019).
218. Ernst, R. K. *et al.* Unique lipid modifications in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the airways of patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **196**, 1088–1092 (2007).
219. Nikaido, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593–656 (2003).
220. Arunmanee, W. *et al.* Gram-negative trimeric porins have specific LPS binding sites that are essential for porin biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E5034–5043 (2016).
221. Whitfield, C. & Trent, M. S. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 99–128 (2014).
222. Engels, W., Endert, J., Kamps, M. A. & van Boven, C. P. Role of lipopolysaccharide in opsonization and phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **49**, 182–189 (1985).
223. Bardoel, B. W. *et al.* *Pseudomonas* Evades Immune Recognition of Flagellin in Both Mammals and Plants. *PLoS Pathog.* **7**, (2011).
224. Wolfgang, M. C., Jyot, J., Goodman, A. L., Ramphal, R. & Lory, S. *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 6664–6668 (2004).
225. Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J. & Madara, J. L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 1882–1885 (2001).
226. Hayashi, F. *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099–1103 (2001).

227. Yu, Y. *et al.* TLR5-mediated activation of p38 MAPK regulates epithelial IL-8 expression via posttranscriptional mechanism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **285**, G282-290 (2003).
228. Khan, M. A. S., Kang, J. & Steiner, T. S. Enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. *Immunology* **112**, 651–660 (2004).
229. Zhang, Z., Reenstra, W., Weiner, D. J., Louboutin, J.-P. & Wilson, J. M. The p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway is coupled to Toll-like receptor 5 to mediate gene regulation in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection in human airway epithelial cells. *Infect. Immun.* **75**, 5985–5992 (2007).
230. Tallant, T. *et al.* Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol.* **4**, 33 (2004).
231. Hajam, I. A., Dar, P. A., Shahnawaz, I., Jaume, J. C. & Lee, J. H. Bacterial flagellin-a potent immunomodulatory agent. *Exp. Mol. Med.* **49**, e373 (2017).
232. Descamps, D. *et al.* Toll-like receptor 5 (TLR5), IL-1 β secretion, and asparagine endopeptidase are critical factors for alveolar macrophage phagocytosis and bacterial killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 1619–1624 (2012).
233. Bardoel, B. W., van Kessel, K. P. M., van Strijp, J. A. G. & Milder, F. J. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* virulence: characterization of the AprA-AprI interface and species selectivity. *J. Mol. Biol.* **415**, 573–583 (2012).
234. Larson, J. E. & Cohen, J. C. Developmental paradigm for early features of cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **40**, 371–377 (2005).

235. Cohen, J. C. & Larson, J. E. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) dependent cytoskeletal tension during lung organogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **235**, 2736–2748 (2006).
236. Meyerholz, D. K. *et al.* Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function produces abnormalities in tracheal development in neonatal pigs and young children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 1251–1261 (2010).
237. Navis, A., Marjoram, L. & Bagnat, M. Cftr controls lumen expansion and function of Kupffer's vesicle in zebrafish. *Dev. Camb. Engl.* **140**, 1703–1712 (2013).
238. Liu, Z. *et al.* CFTR- β -catenin interaction regulates mouse embryonic stem cell differentiation and embryonic development. *Cell Death Differ.* **24**, 98–110 (2017).
239. de Souza, D. a. S., Faucz, F. R., Pereira-Ferrari, L., Sotomaior, V. S. & Raskin, S. Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling. *Andrology* **6**, 127–135 (2018).
240. Puchelle, E. *et al.* Differential localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **7**, 485–491 (1992).
241. Dupuit, F. *et al.* CFTR and differentiation markers expression in non-CF and delta F 508 homozygous CF nasal epithelium. *J. Clin. Invest.* **96**, 1601–1611 (1995).
242. Brezillon, S. *et al.* Decreased expression of the CFTR protein in remodeled human nasal epithelium from non-cystic fibrosis patients. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **72**, 191–200 (1995).
243. Moyer, B. D. *et al.* A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J. Clin. Invest.* **104**, 1353–1361 (1999).

244. LeSimple, P., Liao, J., Robert, R., Gruenert, D. C. & Hanrahan, J. W. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking modulates the barrier function of airway epithelial cell monolayers. *J. Physiol.* **588**, 1195–1209 (2010).
245. Zhang, J. T. *et al.* Downregulation of CFTR promotes epithelial-to-mesenchymal transition and is associated with poor prognosis of breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 2961–2969 (2013).
246. Clarke, L. A., Botelho, H. M., Sousa, L., Falcao, A. O. & Amaral, M. D. Transcriptome meta-analysis reveals common differential and global gene expression profiles in cystic fibrosis and other respiratory disorders and identifies CFTR regulators. *Genomics* **106**, 268–277 (2015).
247. Nyabam, S. *et al.* A novel regulatory role for tissue transglutaminase in epithelial-mesenchymal transition in cystic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 2234–2244 (2016).
248. Rout-Pitt, N., Farrow, N., Parsons, D. & Donnelley, M. Epithelial mesenchymal transition (EMT): a universal process in lung diseases with implications for cystic fibrosis pathophysiology. *Respir. Res.* **19**, 136 (2018).
249. Narayanan, V. *et al.* Osmotic Gradients in Epithelial Acini Increase Mechanical Tension across E-cadherin, Drive Morphogenesis, and Maintain Homeostasis. *Curr. Biol. CB* **30**, 624-633.e4 (2020).
250. Coraux, C., Hajj, R., Lesimple, P. & Puchelle, E. *In vivo* models of human airway epithelium repair and regeneration. *Eur. Respir. Rev.* **14**, 131–136 (2005).
251. Hajj, R. *et al.* Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J. Pathol.* **211**, 340–350 (2007).

252. Schiller, K. R., Maniak, P. J. & O'Grady, S. M. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **299**, C912-921 (2010).
253. Amaral, M. D., Quaresma, M. C. & Pankonien, I. What Role Does CFTR Play in Development, Differentiation, Regeneration and Cancer? *Int. J. Mol. Sci.* **21**, E3133 (2020).
254. Barbry, P., Cavard, A., Chanson, M., Jaffe, A. B. & Plasschaert, L. W. Regeneration of airway epithelial cells to study rare cell states in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **19 Suppl 1**, S42–S46 (2020).
255. Crosby, L. M. & Waters, C. M. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **298**, L715-731 (2010).
256. Beers, M. F. & Morrisey, E. E. The three R's of lung health and disease: repair, remodeling, and regeneration. *J. Clin. Invest.* **121**, 2065–2073 (2011).
257. Adam, D. *et al.* CFTR rescue with VX-809 and VX-770 favors the repair of primary airway epithelial cell cultures from patients with class II mutations in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **17**, 705–714 (2018).
258. Zoso, A., Sofoluwe, A., Bacchetta, M. & Chanson, M. Transcriptomic profile of cystic fibrosis airway epithelial cells undergoing repair. *Sci. Data* **6**, 240 (2019).
259. Ruffin, M. & Brochiero, E. Repair Process Impairment by *Pseudomonas aeruginosa* in Epithelial Tissues: Major Features and Potential Therapeutic Avenues. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 182 (2019).
260. Zulianello, L. *et al.* Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **74**, 3134–3147 (2006).

261. Bejarano, P. A., Langeveld, J. P., Hudson, B. G. & Noelken, M. E. Degradation of basement membranes by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect. Immun.* **57**, 3783–3787 (1989).
262. de Bentzmann, S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors delay airway epithelial wound repair by altering the actin cytoskeleton and inducing overactivation of epithelial matrix metalloproteinase-2. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **80**, 209–219 (2000).
263. Caldwell, C. C. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. *Am. J. Pathol.* **175**, 2473–2488 (2009).
264. Plotkowski, M. C., Zahm, J. M., Tournier, J. M. & Puchelle, E. *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to normal and injured respiratory mucosa. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **87 Suppl 5**, 61–68 (1992).
265. Tsang, K. W. *et al.* Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with human respiratory mucosa *in vitro*. *Eur. Respir. J.* **7**, 1746–1753 (1994).
266. Schwarzer, C., Fischer, H. & Machen, T. E. Chemotaxis and Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to Scratch-Wounded Human Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. *PLoS One* **11**, e0150109 (2016).
267. de Bentzmann, S. *et al.* Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect. Immun.* **64**, 1582–1588 (1996).
268. Roger, P. *et al.* Fibronectin and alpha5beta1 integrin mediate binding of *Pseudomonas aeruginosa* to repairing airway epithelium. *Eur. Respir. J.* **13**, 1301–1309 (1999).
269. Cott, C. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB inhibits tissue repair processes by triggering β -catenin degradation. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 1106–1118 (2016).
270. Ruffin, M. *et al.* Quorum-sensing inhibition abrogates the deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* on airway epithelial repair. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **30**, 3011–3025 (2016).

271. Mercier, J., Ruffin, M., Corvol, H. & Guillot, L. Gene Therapy: A Possible Alternative to CFTR Modulators? *Front. Pharmacol.* **12**, 648203 (2021).
272. Aurora, P. *et al.* Lung transplantation and life extension in children with cystic fibrosis. *Lancet Lond. Engl.* **354**, 1591–1593 (1999).
273. Egan, T. M. *et al.* Improved results of lung transplantation for patients with cystic fibrosis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **109**, 224–234; discussion 234-235 (1995).
274. Van Goor, F. *et al.* Correction of the F508del-CFTR protein processing defect *in vitro* by the investigational drug VX-809. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 18843–18848 (2011).
275. Van Goor, F. *et al.* Rescue of CF airway epithelial cell function *in vitro* by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18825–18830 (2009).
276. Boyle, M. P. *et al.* A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir. Med.* **2**, 527–538 (2014).
277. Wainwright, C. E., Elborn, J. S. & Ramsey, B. W. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1783–1784 (2015).
278. Elborn, J. S. *et al.* Efficacy and safety of lumacaftor/ivacaftor combination therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR by pulmonary function subgroup: a pooled analysis. *Lancet Respir. Med.* **4**, 617–626 (2016).
279. Heijerman, H. G. M. *et al.* Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* **394**, 1940–1948 (2019).
280. Lopes-Pacheco, M. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front. Pharmacol.* **10**, 1662 (2019).

281. Ramsey, B. W. *et al.* A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1663–1672 (2011).
282. Middleton, P. G. *et al.* Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N. Engl. J. Med.* **381**, 1809–1819 (2019).
283. Ridley, K. & Condren, M. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor: The First Triple-Combination Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Modulating Therapy. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther. JPPT Off. J. PPAG* **25**, 192–197 (2020).
284. Burgel, P.-R. *et al.* Real-Life Safety and Effectiveness of Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **201**, 188–197 (2020).
285. Johnson, L. G. *et al.* Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat. Genet.* **2**, 21–25 (1992).
286. Resnier, P., Mottais, A., Sibiril, Y., Le Gall, T. & Montier, T. Challenges and Successes Using Nanomedicines for Aerosol Delivery to the Airways. *Curr. Gene Ther.* **16**, 34–46 (2016).
287. Yonemitsu, Y. *et al.* Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat. Biotechnol.* **18**, 970–973 (2000).
288. Stern, M., Ulrich, K., Geddes, D. M. & Alton, E. W. F. W. Poly (D, L-lactide-co-glycolide)/DNA microspheres to facilitate prolonged transgene expression in airway epithelium *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. *Gene Ther.* **10**, 1282–1288 (2003).
289. Schuster, B. S. *et al.* Overcoming the cystic fibrosis sputum barrier to leading adeno-associated virus gene therapy vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **22**, 1484–1493 (2014).
290. Xia, E., Munegowda, M. A., Cao, H. & Hu, J. Lung gene therapy-How to capture illumination from the light already present in the tunnel. *Genes Dis.* **1**, 40–52 (2014).

291. Gill, D. R. & Hyde, S. C. Delivery of genes into the CF airway. *Thorax* **69**, 962–964 (2014).
292. Drumm, M. L. *et al.* Correction of the cystic fibrosis defect *in vitro* by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* **62**, 1227–1233 (1990).
293. Rich, D. P. *et al.* Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* **347**, 358–363 (1990).
294. Cooney, A. L., McCray, P. B. & Sinn, P. L. Cystic Fibrosis Gene Therapy: Looking Back, Looking Forward. *Genes* **9**, (2018).
295. Schneider-Futschik, E. K. Beyond cystic fibrosis transmembrane conductance regulator therapy: a perspective on gene therapy and small molecule treatment for cystic fibrosis. *Gene Ther.* **26**, 354–362 (2019).
296. Yan, Z., McCray, P. B. & Engelhardt, J. F. Advances in gene therapy for cystic fibrosis lung disease. *Hum. Mol. Genet.* **28**, R88–R94 (2019).
297. Cavazzana-Calvo, M. *et al.* Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**, 669–672 (2000).
298. Cicalese, M. P. *et al.* Update on the safety and efficacy of retroviral gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *Blood* **128**, 45–54 (2016).
299. Cideciyan, A. V. *et al.* Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E517-525 (2013).
300. Nathwani, A. C. *et al.* Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2357–2365 (2011).
301. Cavazzana-Calvo, M. *et al.* Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature* **467**, 318–322 (2010).

302. Persons, D. A. Gene therapy: Targeting β -thalassaemia. *Nature* **467**, 277–278 (2010).
303. Palfi, S. *et al.* Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Lond. Engl.* **383**, 1138–1146 (2014).
304. Maude, S. L. *et al.* Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1507–1517 (2014).
305. Ylä-Herttuala, S. Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **20**, 1831–1832 (2012).
306. Gaudet, D. *et al.* Long-Term Retrospective Analysis of Gene Therapy with Alipogene Tiparvovec and Its Effect on Lipoprotein Lipase Deficiency-Induced Pancreatitis. *Hum. Gene Ther.* **27**, 916–925 (2016).
307. Yu-Wai-Man, P. *et al.* Bilateral visual improvement with unilateral gene therapy injection for Leber hereditary optic neuropathy. *Sci. Transl. Med.* **12**, (2020).
308. Hodges, C. A. & Conlon, R. A. Delivering on the promise of gene editing for cystic fibrosis. *Genes Dis.* **6**, 97–108 (2019).
309. Hawkins, F. J. *et al.* Derivation of Airway Basal Stem Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* (2020).
310. Cutting, G. R. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 45–56 (2015).
311. Guillot, L. *et al.* Lung disease modifier genes in cystic fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **52**, 83–93 (2014).
312. McKone, E. F., Emerson, S. S., Edwards, K. L. & Aitken, M. L. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet Lond. Engl.* **361**, 1671–1676 (2003).

313. Bradley, G. M., Blackman, S. M., Watson, C. P., Doshi, V. K. & Cutting, G. R. Genetic modifiers of nutritional status in cystic fibrosis. *Am. J. Clin. Nutr.* **96**, 1299–1308 (2012).
314. Corvol, H. *et al.* Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nat. Commun.* **6**, 8382 (2015).
315. Castaldo, A. *et al.* TAS2R38 is a novel modifier gene in patients with cystic fibrosis. *Sci. Rep.* **10**, 5806 (2020).
316. Sagwal, S. *et al.* Association of Serum TGF- β 1 Levels with Different Clinical Phenotypes of Cystic Fibrosis Exacerbation. *Lung* **198**, 377–383 (2020).
317. Cruz, D. F., Mitash, N., Farinha, C. M. & Swiatecka-Urban, A. TGF- β 1 Augments the Apical Membrane Abundance of Lemur Tyrosine Kinase 2 to Inhibit CFTR-Mediated Chloride Transport in Human Bronchial Epithelia. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 58 (2020).
318. Saferali, A. *et al.* Immunomodulatory function of the cystic fibrosis modifier gene BPIFA1. *PloS One* **15**, e0227067 (2020).
319. Hassanzad, M. *et al.* TNF α -857 C/T and TNFR2 +587 T/G polymorphisms are associated with cystic fibrosis in Iranian patients. *Eur. J. Med. Genet.* **62**, 103584 (2019).
320. Boëlle, P.-Y., Debray, D., Guillot, L., Corvol, H., & French CF Modifier Gene Study Investigators. SERPINA1 Z allele is associated with cystic fibrosis liver disease. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **21**, 2151–2155 (2019).
321. Paranjapye, A., Ruffin, M., Harris, A. & Corvol, H. Genetic variation in CFTR and modifier loci may modulate cystic fibrosis disease severity. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **19 Suppl 1**, S10–S14 (2020).
322. Gong, J. *et al.* Genetic association and transcriptome integration identify contributing genes and tissues at cystic fibrosis modifier loci. *PLoS Genet.* **15**, e1008007 (2019).

323. Li, W. *et al.* Unraveling the complex genetic model for cystic fibrosis: pleiotropic effects of modifier genes on early cystic fibrosis-related morbidities. *Hum. Genet.* **133**, 151–161 (2014).
324. Miller, M. R. *et al.* Variants in Solute Carrier SLC26A9 Modify Prenatal Exocrine Pancreatic Damage in Cystic Fibrosis. *J. Pediatr.* **166**, 1152-1157.e6 (2015).
325. Pereira, S. V.-N., Ribeiro, J. D., Bertuzzo, C. S. & Marson, F. A. L. Association of clinical severity of cystic fibrosis with variants in the SLC gene family (SLC6A14, SLC26A9, SLC11A1 and SLC9A3). *Gene* **629**, 117–126 (2017).
326. Pereira, S. V. N., Ribeiro, J. D., Bertuzzo, C. S. & Marson, F. A. L. Interaction among variants in the SLC gene family (SLC6A14, SLC26A9, SLC11A1, and SLC9A3) and CFTR mutations with clinical markers of cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **53**, 888–900 (2018).
327. Sun, L. *et al.* Multiple apical plasma membrane constituents are associated with susceptibility to meconium ileus in individuals with cystic fibrosis. *Nat. Genet.* **44**, 562–569 (2012).
328. Sloan, J. L. & Mager, S. Cloning and functional expression of a human Na⁺ and Cl⁻-dependent neutral and cationic amino acid transporter B⁽⁰⁺⁾. *J. Biol. Chem.* **274**, 23740–23745 (1999).
329. Pramod, A. B., Foster, J., Carvelli, L. & Henry, L. K. SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Mol. Aspects Med.* **34**, 197–219 (2013).
330. Ruffin, M. *et al.* Update on SLC6A14 in lung and gastrointestinal physiology and pathophysiology: focus on cystic fibrosis. *Cell. Mol. Life Sci.* (2020) doi:10.1007/s00018-020-03487-x.

331. Rogala-Koziarska, K., Samluk, Ł. & Nałęcz, K. A. Amino acid transporter SLC6A14 depends on heat shock protein HSP90 in trafficking to the cell surface. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1866**, 1544–1555 (2019).
332. Kovalchuk, V. *et al.* Trafficking of the amino acid transporter B⁰⁺ (SLC6A14) to the plasma membrane involves an exclusive interaction with SEC24C for its exit from the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1866**, 252–263 (2019).
333. Samluk, L., Czeredys, M., Skowronek, K. & Nałęcz, K. A. Protein kinase C regulates amino acid transporter ATB⁰⁺. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **422**, 64–69 (2012).
334. Nałęcz, K. A. Amino Acid Transporter SLC6A14 (ATB⁰⁺) - A Target in Combined Anti-cancer Therapy. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 594464 (2020).
335. Eriksson, A., Flach, C.-F., Lindgren, A., Kvifors, E. & Lange, S. Five mucosal transcripts of interest in ulcerative colitis identified by quantitative real-time PCR: a prospective study. *BMC Gastroenterol.* **8**, 34 (2008).
336. Flach, C.-F. *et al.* Differential expression of intestinal membrane transporters in cholera patients. *FEBS Lett.* **581**, 3183–3188 (2007).
337. Anderson, C. M. H., Howard, A., Walters, J. R. F., Ganapathy, V. & Thwaites, D. T. Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H⁺-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na⁺- and Cl⁻-dependent TauT (SLC6A6). *J. Physiol.* **587**, 731–744 (2009).
338. Ahmadi, S. *et al.* Augmentation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function in Human Bronchial Epithelial Cells via SLC6A14-Dependent Amino Acid Uptake. Implications for Treatment of Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **61**, 755–764 (2019).

339. Kou, L. *et al.* Dual targeting of l-carnitine-conjugated nanoparticles to OCTN2 and ATB^{0,+} to deliver chemotherapeutic agents for colon cancer therapy. *Drug Deliv.* **24**, 1338–1349 (2017).
340. Ikpa, P. T. *et al.* Transcriptome analysis of the distal small intestine of Cftr null mice. *Genomics* **112**, 1139–1150 (2020).
341. Wang, H. *et al.* l-Tryptophan Activates Mammalian Target of Rapamycin and Enhances Expression of Tight Junction Proteins in Intestinal Porcine Epithelial Cells. *J. Nutr.* **145**, 1156–1162 (2015).
342. Galletta, L. J. *et al.* An electrogenic amino acid transporter in the apical membrane of cultured human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **275**, L917-923 (1998).
343. Sloan, J. L., Grubb, B. R. & Mager, S. Expression of the amino acid transporter ATB^{0,+} in lung: possible role in luminal protein removal. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **284**, L39-49 (2003).
344. Ingoglia, F. *et al.* Functional activity of L-carnitine transporters in human airway epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1858**, 210–219 (2016).
345. Luo, Q. *et al.* ATB^{0,+} transporter-mediated targeting delivery to human lung cancer cells via aspartate-modified docetaxel-loading stealth liposomes. *Biomater. Sci.* **5**, 295–304 (2017).
346. Di Paola, M. *et al.* SLC6A14 Is a Genetic Modifier of Cystic Fibrosis That Regulates *Pseudomonas aeruginosa* Attachment to Human Bronchial Epithelial Cells. *mBio* **8**, (2017).
347. Xu, Y. *et al.* Single-cell RNA sequencing identifies diverse roles of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight* **1**, e90558 (2016).
348. Gorrieri, G. *et al.* Goblet Cell Hyperplasia Requires High Bicarbonate Transport To Support Mucin Release. *Sci. Rep.* **6**, 36016 (2016).

349. Chin, S. *et al.* Lipophilicity of the Cystic Fibrosis Drug, Ivacaftor (VX-770), and Its Destabilizing Effect on the Major CF-causing Mutation: F508del. *Mol. Pharmacol.* **94**, 917–925 (2018).
350. Sikder, M. O. F., Yang, S., Ganapathy, V. & Bhutia, Y. D. The Na⁺/Cl⁻-Coupled, Broad-Specific, Amino Acid Transporter SLC6A14 (ATB^{0,+}): Emerging Roles in Multiple Diseases and Therapeutic Potential for Treatment and Diagnosis. *AAPS J.* **20**, 12 (2017).
351. Gupta, N. *et al.* Up-regulation of the amino acid transporter ATB^(0,+) (SLC6A14) in carcinoma of the cervix. *Gynecol. Oncol.* **100**, 8–13 (2006).
352. Gupta, N. *et al.* Upregulation of the amino acid transporter ATB^{0,+} (SLC6A14) in colorectal cancer and metastasis in humans. *Biochim. Biophys. Acta* **1741**, 215–223 (2005).
353. Mao, H. *et al.* Aberrant SLC6A14 Expression Promotes Proliferation and Metastasis of Colorectal Cancer via Enhancing the JAK2/STAT3 Pathway. *Oncotargets Ther.* **14**, 379–392 (2021).
354. Sikder, M. O. F. *et al.* SLC6A14, a Na⁺/Cl⁻-coupled amino acid transporter, functions as a tumor promoter in colon and is a target for Wnt signaling. *Biochem. J.* (2020) doi:10.1042/BCJ20200099.
355. Coothankandaswamy, V. *et al.* Amino acid transporter SLC6A14 is a novel and effective drug target for pancreatic cancer. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 3292–3306 (2016).
356. Penheiter, A. R. *et al.* Transcriptomic and Immunohistochemical Profiling of SLC6A14 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *BioMed Res. Int.* **2015**, 593572 (2015).
357. Li, Y. *et al.* Screening and validating the core biomarkers in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Math. Biosci. Eng. MBE* **17**, 910–927 (2019).

358. Karunakaran, S. *et al.* SLC6A14 (ATB⁰⁺) protein, a highly concentrative and broad specific amino acid transporter, is a novel and effective drug target for treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Biol. Chem.* **286**, 31830–31838 (2011).
359. Bacci, M. *et al.* Reprogramming of Amino Acid Transporters to Support Aspartate and Glutamate Dependency Sustains Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cell Rep.* **28**, 104–118.e8 (2019).
360. Babu, E. *et al.* Deletion of the amino acid transporter Slc6a14 suppresses tumour growth in spontaneous mouse models of breast cancer. *Biochem. J.* **469**, 17–23 (2015).
361. Li, X.-H. *et al.* Integrated analysis of differential miRNA and mRNA expression profiles in human radioresistant and radiosensitive nasopharyngeal carcinoma cells. *PloS One* **9**, e87767 (2014).
362. Zhu, M. *et al.* Up-regulation of microRNAs, miR21 and miR23a in human liver cancer cells treated with Coptidis rhizoma aqueous extract. *Exp. Ther. Med.* **2**, 27–32 (2011).
363. Bisognin, A., Sales, G., Coppe, A., Bortoluzzi, S. & Romualdi, C. MAGIA²: from miRNA and genes expression data integrative analysis to microRNA-transcription factor mixed regulatory circuits (2012 update). *Nucleic Acids Res.* **40**, W13–21 (2012).
364. Eriksson, A., Jennische, E., Flach, C.-F., Jorge, A. & Lange, S. Real-time PCR quantification analysis of five mucosal transcripts in patients with Crohn's disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **20**, 290–296 (2008).
365. Van der Goten, J. *et al.* Integrated miRNA and mRNA Expression Profiling in Inflamed Colon of Patients with Ulcerative Colitis. *PLoS ONE* **9**, e116117 (2014).
366. Yanai, H. *et al.* Gene expression alterations in ulcerative colitis patients after restorative proctocolectomy extend to the small bowel proximal to the pouch. *Gut* **64**, 756–764 (2015).

367. Low, E. N. D., Mokhtar, N. M., Wong, Z. & Raja Ali, R. A. Colonic Mucosal Transcriptomic Changes in Patients with Long-Duration Ulcerative Colitis Revealed Colitis-Associated Cancer Pathways. *J. Crohns Colitis* **13**, 755–763 (2019).
368. D'Argenio, G. *et al.* Experimental colitis: decreased Octn2 and Atb⁰⁺ expression in rat colonocytes induces carnitine depletion that is reversible by carnitine-loaded liposomes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **20**, 2544–2546 (2006).
369. Cecchini, M. J., Hosein, K., Howlett, C. J., Joseph, M. & Mura, M. Comprehensive gene expression profiling identifies distinct and overlapping transcriptional profiles in non-specific interstitial pneumonia and idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* **19**, 153 (2018).
370. Suviolahti, E. *et al.* The SLC6A14 gene shows evidence of association with obesity. *J. Clin. Invest.* **112**, 1762–1772 (2003).
371. Corpeleijn, E. *et al.* Obesity-related polymorphisms and their associations with the ability to regulate fat oxidation in obese Europeans: the NUGENOB study. *Obes. Silver Spring Md* **18**, 1369–1377 (2010).
372. Durand, E. *et al.* Polymorphisms in the amino acid transporter solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter) member 14 gene contribute to polygenic obesity in French Caucasians. *Diabetes* **53**, 2483–2486 (2004).
373. Miranda, R. C. K. *et al.* SLC6A14 and 5-HTR2C polymorphisms are associated with food intake and nutritional status in children. *Clin. Biochem.* **48**, 1277–1282 (2015).
374. Noveski, P., Mircevska, M., Plaseski, T., Peterlin, B. & Plaseska-Karanfilska, D. Study of Three Single Nucleotide Polymorphisms in the SLC6A14 Gene in Association with Male Infertility. *Balk. J. Med. Genet. BJMG* **17**, 61–66 (2014).
375. Anderson, C. M. H., Ganapathy, V. & Thwaites, D. T. Human solute carrier SLC6A14 is the beta-alanine carrier. *J. Physiol.* **586**, 4061–4067 (2008).

376. Jain-Vakkalagadda, B. *et al.* Identification of a Na⁺-dependent cationic and neutral amino acid transporter, B^(0,+), in human and rabbit cornea. *Mol. Pharm.* **1**, 338–346 (2004).
377. Kekuda, R. *et al.* Molecular and functional characterization of intestinal Na⁺-dependent neutral amino acid transporter B0. *Am. J. Physiol.* **272**, G1463-1472 (1997).
378. Uchiyama, T. *et al.* Functional characterization and cloning of amino acid transporter B^{0,+} (ATB^{0,+}) in primary cultured rat pneumocytes. *J. Cell. Physiol.* **214**, 645–654 (2008).
379. Ugawa, S. *et al.* Characterization of a mouse colonic system B^(0,+) amino acid transporter related to amino acid absorption in colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281**, G365-370 (2001).
380. Ahmadi, S. *et al.* SLC6A14, an amino acid transporter, modifies the primary CF defect in fluid secretion. *eLife* **7**, e37963 (2018).
381. Schuster, A., Haarmann, A. & Wahn, V. Cytokines in neutrophil-dominated airway inflammation in patients with cystic fibrosis. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* **252 Suppl 1**, S59-60 (1995).
382. Nixon, G. M. *et al.* Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J. Pediatr.* **138**, 699–704 (2001).
383. Henry, R. L., Mellis, C. M. & Petrovic, L. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **12**, 158–161 (1992).
384. Mercier, J. *et al.* SLC6A14 Modulates Lung Disease Severity in Cystic Fibrosis and Affects mTOR Phosphorylation and Bronchial Epithelial Repair. (2021). doi:10.21203/rs.3.rs-591564/v1.
385. Barilli, A. *et al.* Flagellin From *Pseudomonas aeruginosa* Stimulates ATB^{0,+} Transporter for Arginine and Neutral Amino Acids in Human Airway Epithelial Cells. *Front. Immunol.* **12**, 641563 (2021).

386. Bellec, J. *et al.* CFTR inactivation by lentiviral vector-mediated RNA interference and CRISPR-Cas9 genome editing in human airway epithelial cells. *Curr. Gene Ther.* **15**, 447–459 (2015).
387. Flach, C.-F. *et al.* Detection of elafin as a candidate biomarker for ulcerative colitis by whole-genome microarray screening. *Inflamm. Bowel Dis.* **12**, 837–842 (2006).
388. Al-Sadi, R., Ye, D., Dokladny, K. & Ma, T. Y. Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 5653–5661 (2008).
389. Zhu, Y. *et al.* Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Secrete LasB Elastase to Induce Hemorrhagic Diffuse Alveolar Damage in Mice. *J. Inflamm. Res.* **14**, 3767–3780 (2021).
390. Casilag, F. *et al.* The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. *Infect. Immun.* **84**, 162–171 (2016).
391. Mohamed, F. B. *et al.* A Crucial Role of Flagellin in the Induction of Airway Mucus Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* **7**, e39888 (2012).
392. Blohmke, C. J. *et al.* Innate immunity mediated by TLR5 as a novel antiinflammatory target for cystic fibrosis lung disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 7764–7773 (2008).
393. Rouillard, K. R., Markovetz, M. R., Bacudio, L. G., Hill, D. B. & Schoenfisch, M. H. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Eradication via Nitric Oxide-Releasing Cyclodextrins. *ACS Infect. Dis.* **6**, 1940–1950 (2020).
394. Cutruzzolà, F. & Frankenberg-Dinkel, N. Origin and Impact of Nitric Oxide in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J. Bacteriol.* **198**, 55–65 (2016).

395. Smith, A. J. P., Deloukas, P. & Munroe, P. B. Emerging applications of genome-editing technology to examine functionality of GWAS-associated variants for complex traits. *Physiol. Genomics* **50**, 510–522 (2018).
396. Kumar, A., Asano, E. & Chugani, H. T. α -[^{11}C]-methyl-L-tryptophan PET for tracer localization of epileptogenic brain regions: clinical studies. *Biomark. Med.* **5**, 577–584 (2011).
397. Diksic, M. & Young, S. N. Study of the brain serotonergic system with labeled α -methyl-L-tryptophan. *J. Neurochem.* **78**, 1185–1200 (2001).
398. Sivaprakasam, S. *et al.* α -Methyl-L-tryptophan as a weight-loss agent in multiple models of obesity in mice. *Biochem. J.* **478**, 1347–1358 (2021).
399. Kou, L. *et al.* Transporter-Targeted Nano-Sized Vehicles for Enhanced and Site-Specific Drug Delivery. *Cancers* **12**, E2837 (2020).
400. Karunakaran, S. *et al.* Interaction of tryptophan derivatives with SLC6A14 (ATB $^{0,+}$) reveals the potential of the transporter as a drug target for cancer chemotherapy. *Biochem. J.* **414**, 343–355 (2008).
401. Sniegowski, T., Korac, K., Bhutia, Y. D. & Ganapathy, V. SLC6A14 and SLC38A5 Drive the Glutaminolysis and Serine-Glycine-One-Carbon Pathways in Cancer. *Pharm. Basel Switz.* **14**, 216 (2021).
402. Edwards, D. N. *et al.* Selective glutamine metabolism inhibition in tumor cells improves antitumor T lymphocyte activity in triple-negative breast cancer. *J. Clin. Invest.* **131**, 140100 (2021).
403. Bröer, S. Amino Acid Transporters as Targets for Cancer Therapy: Why, Where, When, and How. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, E6156 (2020).
404. Edwards, N. *et al.* Amino acid derivatives are substrates or non-transported inhibitors of the amino acid transporter PAT2 (slc36a2). *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 260–270 (2011).

405. Liu, G. Y. & Sabatini, D. M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 183–203 (2020).
406. Kaur, H. & Moreau, R. Role of mTORC1 in intestinal epithelial repair and tumorigenesis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **76**, 2525–2546 (2019).
407. Raslan, A. A. & Yoon, J. K. WNT Signaling in Lung Repair and Regeneration. *Mol. Cells* **43**, 774–783 (2020).
408. Thompson, M., Nejak-Bowen, K. & Monga, S. (Paul). Crosstalk of the Wnt Signaling Pathway. in *Targeting the Wnt Pathway in Cancer* 51–80 (2011). doi:10.1007/978-1-4419-8023-6_4.
409. Foster, K. G. & Fingar, D. C. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J. Biol. Chem.* **285**, 14071–14077 (2010).
410. Kovalchuk, V. & Nałęcz, K. A. Trafficking to the Cell Surface of Amino Acid Transporter SLC6A14 Upregulated in Cancer Is Controlled by Phosphorylation of SEC24C Protein by AKT Kinase. *Cells* **10**, 1800 (2021).
411. Rabanal-Ruiz, Y., Otten, E. G. & Korolchuk, V. I. mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays Biochem.* **61**, 565–584 (2017).
412. Maiuri, L. & Kroemer, G. Autophagy delays progression of the two most frequent human monogenetic lethal diseases: cystic fibrosis and Wilson disease. *Aging* **10**, 3657–3661 (2018).
413. Luciani, A. *et al.* Targeting autophagy as a novel strategy for facilitating the therapeutic action of potentiators on $\Delta F508$ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Autophagy* **8**, 1657–1672 (2012).
414. Villella, V. R. *et al.* Targeting the Intracellular Environment in Cystic Fibrosis: Restoring Autophagy as a Novel Strategy to Circumvent the CFTR Defect. *Front. Pharmacol.* **4**, 1 (2013).

415. Junkins, R. D., McCormick, C. & Lin, T.-J. The emerging potential of autophagy-based therapies in the treatment of cystic fibrosis lung infections. *Autophagy* **10**, 538–547 (2014).
416. Chen, G. *et al.* IL-1 β dominates the promucin secretory cytokine profile in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* **129**, 4433–4450 (2019).
417. Montgomery, S. T. *et al.* Interleukin-1 is associated with inflammation and structural lung disease in young children with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **17**, 715–722 (2018).
418. Reiniger, N. *et al.* Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection requires cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-modulated interleukin-1 (IL-1) release and signaling through the IL-1 receptor. *Infect. Immun.* **75**, 1598–1608 (2007).
419. Gurczynski, S. J. & Moore, B. B. IL-17 in the lung: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **314**, L6–L16 (2018).

Sites internet :

Bilan des données 2019 du Registre français de la mucoviscidose :

https://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/registre_2019_vf.pdf

Protocole national de diagnostic et de soins 2017 :

https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-09/pnds_2017_vf1.pdf

Communications et formations scientifiques

I- Liste des publications

Mercier, J., Calmel, C., Mésinè, J., Sutanto, E., Merabtene, F., Longchamp, E., Sage, E., Kicic, A., Boëlle, P-Y., Corvol, H., Ruffin, M. & Guillot, L.. SLC6A14 Modulates Lung Disease Severity in Cystic Fibrosis and Affects mTOR Phosphorylation and Bronchial Epithelial Repair. (2021). doi:10.21203/rs.3.rs-591564/v1.

Mercier, J., Ruffin, M., Corvol, H. & Guillot, L. Gene Therapy: A Possible Alternative to CFTR Modulators? *Front Pharmacol* 12, 648203 (2021). doi: 10.3389/fphar.2021.648203.

Ruffin, M. *, **Mercier, J.***, Calmel, C., Mésinè, J., Bigot, J., Sutanto, E., Kicic, A., Corvol, H. & Guillot, L. Update on SLC6A14 in lung and gastrointestinal physiology and pathophysiology: focus on cystic fibrosis. *Cell. Mol. Life Sci.* (2020) doi:10.1007/s00018-020-03487-x. * co-first authors

Ruffin, M., Bigot, J., Calmel, C., **Mercier, J.**, Pizzorno, A., Rosa-Calatrava, M., Corvol, H., Balloy, V., Terrier, O. & Guillot, L. Flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* modulates SARS-CoV-2 infectivity in CF airway epithelial cells by increasing TMPRSS2 expression. *bioRxiv* 2020.08.24.264564 (2020) doi:10.1101/2020.08.24.264564.

II- Liste des communications

a. Orales

- 21ème Colloque français des jeunes chercheurs - Vaincre La Mucoviscidose (Paris) 2020 : Présentation orale de 10 min, en français
- European Young Investigators Meeting (EYIM) 2020 : Poster pitch de 3min, en anglais
- Workshop/Summer School « Epithelial Systems: Physiology and Pathophysiology » (Lisbonne) - Juillet 2019 : Summer school : Présentation de 5-10min, en anglais (Travel grant)
- Séminaire annuel du Centre de Recherche Saint-Antoine (Lieuxaint) – Novembre 2021 : Présentation orale de 10min, en français

b. Affichées

- Journées de la Recherche Respiratoire (Marseille) – Octobre 2018 : Poster
- Séminaire annuel du Centre de Recherche Saint-Antoine (Montvillargenne) – Novembre 2018: Poster

- 20ème Colloque français des jeunes chercheurs - Vaincre La Mucoviscidose (Paris) – Février 2019 : Poster
- Journées de l’Ecole Doctorale (ED 394 - Paris) – Mai 2019 : Poster (anglais)
- Séminaire annuel du Centre de Recherche Saint-Antoine (Lieuxaint) – Novembre 2019 : Poster
- Journées de la Recherche Respiratoire (Brest) – Octobre 2021 : Poster

c. Projetées par visioconférence

- 22ème Colloque français des jeunes chercheurs - Vaincre La Mucoviscidose (Paris) – Février 2021 : Poster virtuel → Prix du meilleur poster virtuel
- Journées de l’Ecole Doctorale 394 – Mai 2021 : présentation de poster en 5min, français

III- Liste des congrès et événements organisés

- Journées de l’école doctorale 2020 – Annulées pour cause de COVID
 - Planification du programme
 - Organisation de l’animation scientifique
 - Recherche de sponsors et de traiteurs
 - Sélection de résumés
- Session étudiante du Séminaire annuel du Centre de Recherche Saint-Antoine 2019
 - Choix d’une thématique : « *Le Festival du CRSAnnes* »
 - Organisation de l’animation scientifique (Quizz scientifique, Poster teasing, Concours photo, Soirée dansante et Blind test, Vidéo teasing, Création d’affiches de films aux noms des équipes du CRSA, Création de badges et pins)
 - Gestion de budget : pins, décoration, accessoires, prix pour les lauréats
 - Gestion d’équipes : environ 150 participants à répartir en fonction de leur équipe d’origine et de leurs heures de présence au congrès, afin de créer de nouvelles équipes les plus hétéroclites possibles.
- Club des Jeunes Chercheurs du CRSA – Membre du bureau

- Création de novo du club, avec 8 autres membres
- Organisation des « Journées d'accueil des nouveaux entrants » : Accueil avec totebags de bienvenue des nouveaux étudiants du centre ; Discours de bienvenue du directeur du centre ; Organisation de la visite des différents bâtiments et plateformes, gestion du roulement des petits groupes (restrictions sanitaires).
- Organisation des Répétitions du concours de l'Ecole Doctorale : Concours blanc pour tous les M2 du centre qui souhaitent s'entraîner devant un jury composé de doctorants ayant ou non passé le concours. Tous les domaines sont représentés au sein du jury afin de se rapprocher au mieux des conditions du concours.
- Organisation d'Afterworks
- Projets éco-responsables et d'animations scientifiques (problématique de gestion des déchets au niveau du centre, projet de mise en place de tables rondes, intervenants extérieurs afin de discuter de différents débouchés professionnels,...)

IV-Formations

- Mission doctorale : Chargée de mission d'enseignement (64h/an)
- Summer school : « Epithelial Systems: Physiology and Pathophysiology »
- Formation à la pédagogie (spécialité biologie)
- Formation « Du QI au QE : du quotient intellectuel au quotient émotionnel »
- Formation « Expérimentation animale, éthique et bien-traitance – Formation générale des concepteurs de projets scientifiques (Rongeurs et Lagomorphes) »
- Formations « Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche » (FUN MOOC, Université de Bordeaux ; Ateliers de sensibilisation, intégrité scientifique BIO)
- Auto-formation FUN MOOC : « Apprendre à coder avec Python »
- Auto-formation FUN MOOC : « Ouvrez les portes du laboratoire : cellules et cellules souches », Université de Nantes

Annexes

I- Annexe 1 : Autres publications

a. *SLC6A14*, un gène modificateur de la mucoviscidose

1. Résumé

*Bien que la mucoviscidose soit une maladie monogénique, une diversité phénotypique considérable est observée chez des patients portant les mêmes variants de CFTR. Grâce au développement d'outils nouveaux et puissants pour la réalisation d'études génétiques, de nombreux gènes appelés « gènes modificateurs » ont été découverts comme étant associés à la sévérité de l'atteinte pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose. Parmi ces gènes, le gène *SLC6A14* pourrait moduler la réponse anti-infectieuse et l'intégrité de l'épithélium des voies aériennes, constituant ainsi une cible thérapeutique potentielle pour améliorer la fonction respiratoire des patients.*

Courte revue publiée en tant que 2^e auteure dans la *Revue des Maladies Respiratoires* en mars 2020, à la suite du prix du meilleur poster gagné par Dr. Manon Ruffin aux Journées de la Recherche Respiratoire (congrès J2R).

2. Article

Revue des Maladies Respiratoires (2020) 37, 218–221



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com

JOURNÉES DE RECHERCHE RESPIRATOIRE

SLC6A14, un gène modificateur dans la mucoviscidose

*SLC6A14, a modifier gene in cystic fibrosis***M. Ruffin^{a,*}, J. Mercier^a, C. Calmel^a, J. Mésinèle^a,
H. Corvol^{a,b}, L. Guillot^a**^a Sorbonne université, Inserm UMR S 938, Centre de recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris, France^b Pneumologie pédiatrique, AP–HP, hôpital Trousseau, Paris, France

Reçu le 12 janvier 2020 ; accepté le 12 janvier 2020

Disponible sur Internet le 4 mars 2020

MOTS CLÉSMucoviscidose ;
Gènes modificateurs ;
SLC6A14 ;
Infection

Résumé Bien que la mucoviscidose soit une maladie monogénique, une diversité phénotypique considérable est observée chez des patients portant les mêmes mutations de *CFTR*. Grâce au développement d'outils nouveaux et puissants pour la réalisation d'études génétiques, de nombreux gènes appelés « gènes modificateurs » ont été découverts comme étant associés à la sévérité de l'atteinte pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose. Parmi ces gènes, le gène *SLC6A14* pourrait moduler la réponse anti-infectieuse et l'intégrité de l'épithélium des voies aériennes, constituant ainsi une cible thérapeutique potentielle pour améliorer la fonction respiratoire des patients.

© 2020 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDSCystic fibrosis;
Modifier genes;
SLC6A14;
Infection

Summary Although cystic fibrosis is a monogenic disease, a considerable clinical phenotypic variability is observed in patients with the same *CFTR* mutations. Thanks to the development of new and powerful tools for carrying out genetic studies, several genes called "modifier genes" have been identified as being associated with the severity of the lung function disorder in

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : manon.ruffin@inserm.fr (M. Ruffin).

cystic fibrosis patients. Among these genes, *SLC6A14* may modulate the anti-infective response and epithelial integrity of the airways, thus providing a potential therapeutic target to improve the patient's lung function.

© 2020 SPLF. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

SLC6A14 est un gène modificateur de la sévérité de l'atteinte pulmonaire dans la mucoviscidose

La mucoviscidose (ou *cystic fibrosis* en anglais : CF) est une maladie génétique rare à transmission autosomique récessive dont les manifestations cliniques concernent plusieurs organes. Cependant, la prise en charge de l'atteinte pulmonaire demeure la première préoccupation car l'insuffisance respiratoire est la principale cause de morbi-mortalité des patients atteints de mucoviscidose. La présence de variants génétiques dans la séquence codante du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) induit une perturbation des échanges ioniques et hydriques au niveau de l'épithélium des voies aériennes. On observe alors une altération de la clairance mucociliaire qui favorise la colonisation des voies aériennes par différents pathogènes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus*, *Stenotrophomonas maltophilia*), une inflammation exacerbée et une réparation anormale de l'épithélium des voies aériennes ayant pour conséquence une destruction progressive du tissu pulmonaire.

Bien que la mucoviscidose soit une maladie monogénique, le phénotype pulmonaire des patients portant les mêmes variants génétiques de *CFTR* vivant dans le même environnement est variable. Pour l'atteinte pulmonaire en particulier, le déclin de la fonction respiratoire au cours du temps est plus ou moins rapide. Ceci suggère que des variants génétiques, situés en dehors du locus de *CFTR*, pourraient contribuer à la sévérité de l'atteinte pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose. Les gènes dans lesquels sont situés ces variants génétiques sont appelés « gènes modificateurs » et leur contribution à la variation de la fonction respiratoire est estimée à près de 50 % [1]. Les études génétiques réalisées depuis les années 2000 sur des cohortes de patients atteints de mucoviscidose ont permis d'identifier plusieurs gènes modificateurs de la fonction respiratoire des patients. Ainsi, une étude génétique de grande ampleur (6365 patients CF) a permis d'identifier 5 régions chromosomiques (chr3q29 : *MUC4/MUC20*, chr5p15.3 : *SLC9A3*, chr6p21.3 : *HLA de classe II*, chr11p12-p13 : *EHF/APIP* et chrXq22-q23 : *AGTR2/SLC6A14*) contenant des gènes potentiellement responsables d'une partie de la variabilité du phénotype pulmonaire [2]. Cette étude a notamment mis en évidence une association entre certains variants génétiques du gène *SLC6A14* (*Solute Carrier Family 6 Member 14*, aussi connu sous le nom *ATB^{0,+}*) et la sévérité du phénotype pulmonaire des patients. Par ailleurs, certains variants génétiques de *SLC6A14* ont été associés à la précocité de la survenue de l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose [3]. Ces études suggèrent que la protéine *SLC6A14* pourrait jouer un

rôle important dans la physiopathologie pulmonaire de cette pathologie.

Notre objectif est ainsi de déterminer les mécanismes par lesquels *SLC6A14* intervient dans la physiopathologie de la mucoviscidose.

Hypothèses sur les rôles possibles de SLC6A14 dans la physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose

Le gène *SLC6A14* est localisé sur le chromosome X et code pour une protéine de 642 acides aminés et 72,15 kDa. La protéine *SLC6A14* est un transporteur membranaire qui utilise l'énergie fournie par les gradients d'ions Na^+ et Cl^- pour importer des acides aminés dans le cytoplasme de différents types de cellules. La séquence protéique de *SLC6A14* suggère qu'elle est constituée de 12 domaines transmembranaires et que ses extrémités N- et C-ter sont

situées du côté cytoplasmique.

Parmi les transporteurs d'acides aminés connus, *SLC6A14* est celui qui possède la plus large sélectivité, il transporte tous les acides aminés protéinogènes sauf l'aspartate, le glutamate et la proline. Par ailleurs, il a la capacité à concentrer de manière très importante les acides aminés qu'il transporte dans le cytoplasme des cellules induisant ainsi une déprivation du milieu extracellulaire en acides aminés.

SLC6A14 semble être principalement exprimé au niveau du tissu pulmonaire. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer son profil d'expression précis mais il a d'ores et déjà été établi que plusieurs lignées de cellules épithéliales des voies aériennes, principalement d'origine bronchique, expriment *SLC6A14* [4–7].

Le rôle précis de *SLC6A14* dans la physiologie pulmonaire et les conséquences fonctionnelles de l'expression de ses variants génétiques (qui pourraient moduler son expression) dans la mucoviscidose ont été peu étudiés. Cependant, les informations dont nous disposons à l'heure actuelle sur *SLC6A14* permettent de poser plusieurs hypothèses qui pourraient permettre d'expliquer son implication dans la physiopathologie de l'atteinte pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose. Au niveau pulmonaire, plusieurs éléments suggèrent que *SLC6A14* pourrait être impliqué dans la réponse anti-infectieuse (Fig. 1). En effet, l'activation de *SLC6A14* pourrait permettre de dépriver le liquide de surface des voies aériennes en acides aminés ce qui créerait un environnement défavorable à la croissance bactérienne. D'autre part, *SLC6A14* transporte l'arginine qui est un précurseur de l'oxyde nitrique ou NO. Le NO est une molécule importante car il a été montré qu'elle a des propriétés bactéricides et qu'elle favorise le déclenchement d'une

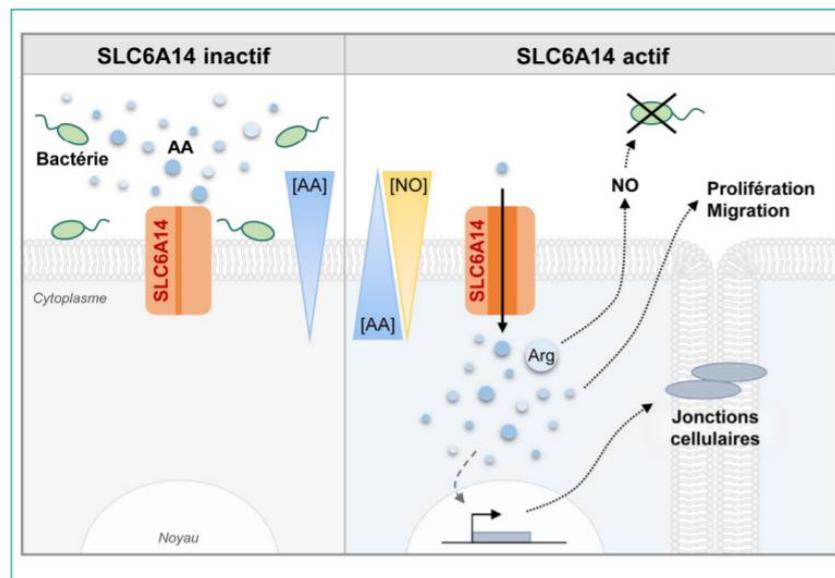


Figure 1. Représentation schématique des différentes hypothèses permettant d'expliquer l'implication de SLC6A14 dans la réponse anti-infectieuse et l'intégrité épithéliale au niveau pulmonaire. AA : acides aminés ; Arg : arginine ; NO : oxyde nitrique.

réponse inflammatoire et immunitaire efficace au niveau des voies aériennes. Une modulation de l'import d'arginine par SLC6A14 dans les cellules de l'épithélium des voies aériennes pourrait donc avoir des conséquences importantes sur la réponse de l'hôte à une infection bactérienne [8]. Enfin, il a été montré que l'inhibition du transport d'acides aminés dépendant de SLC6A14 induit une augmentation de l'adhésion de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales bronchiques [4].

SLC6A14 pourrait également être impliqué dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium des voies aériennes (Fig. 1). En effet, il a été montré que SLC6A14, qui est surexprimé dans différents cancers [9–12], est impliqué dans les processus de prolifération et de migration des cellules cancéreuses. Il a par ailleurs été montré que l'expression de SLC6A14, qui est modulée dans certaines pathologies inflammatoires intestinales chroniques comme la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn [13], pourrait favoriser l'expression de protéines formant les jonctions serrées [14]. Ces résultats suggèrent que SLC6A14 pourrait jouer un rôle important dans le maintien de l'intégrité des épithélia qui est garantie par une bonne imperméabilité (dépendante des jonctions cellule–cellule) et une réparation efficace en cas de lésions (associant des processus de migration et de prolifération cellulaire). Au niveau de l'épithélium des voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose, la présence persistante de facteurs de virulence bactériens et molécules pro-inflammatoires génère des lésions. En condition non pathologique, des mécanismes de réparation permettent de reconstituer le tissu après lésion mais ils sont dérégulés chez les patients atteints de mucoviscidose [15,16]. L'implication éventuelle de SLC6A14 dans le maintien de l'intégrité de

Conclusion

Bien que des avancées remarquables en génétique aient permis d'identifier plusieurs gènes modificateurs de la sévérité de l'atteinte pulmonaire de la mucoviscidose, nous ne disposons actuellement que de peu d'éléments qui permettraient d'expliquer leurs impacts au niveau physiologique et physiopathologique. *SLC6A14* est l'un de ces gènes. Plusieurs pistes suggèrent que ce transporteur d'acides aminés pourrait moduler la réponse anti-infectieuse et/ou l'intégrité de l'épithélium des voies aériennes mais des études supplémentaires doivent être envisagées pour valider ou invalider ces hypothèses. Déterminer les conséquences fonctionnelles des variants génétiques identifiés est également essentiel pour mieux comprendre leur impact chez les patients. Ces avancées pourraient permettre d'utiliser SLC6A14 comme outil prédictif ou cible thérapeutique pour améliorer la fonction respiratoire des patients atteints de mucoviscidose.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 2015;6:45–56.
- [2] Corvol H, Blackman SM, Boelle PY, et al. Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nat Commun* 2015;6:8382.
- [3] Li W, Soave D, Miller MR, et al. Unraveling the complex gene-

- [4] Di Paola M, Park AJ, Ahmadi S, et al. SLC6A14 is a genetic modifier of cystic fibrosis that regulates *Pseudomonas aeruginosa* attachment to human bronchial epithelial cells. *MBio* 2017;8, pii: e02073-17.
- [5] Ingoglia F, Visigalli R, Rotoli BM, et al. Functional activity of L-carnitine transporters in human airway epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2016;1858:210–9.
- [6] Muller A, Chiotellis A, Keller C, et al. Imaging tumour ATB0,+ transport activity by PET with the cationic amino acid O-2 (2-[18F]fluoroethyl)methyl-amino)ethyltyrosine. *Mol Imaging Biol* 2014;16:412–20.
- [7] Rotoli BM, Bussolati O, Sala R, et al. The transport of cationic amino acids in human airway cells: expression of system y+L activity and transepithelial delivery of NOS inhibitors. *FASEB J* 2005;19:810–2.
- [8] Grasemann H, Ratjen F. Nitric oxide and L-arginine deficiency in cystic fibrosis. *Curr Pharm Des* 2012;18:726–36.
- [9] Coothankandaswamy V, Cao S, Xu Y, et al. Amino acid transporter SLC6A14 is a novel and effective drug target for pancreatic cancer. *Br J Pharmacol* 2016;173:3292–306.
- [10] Gupta N, Miyauchi S, Martindale RG, et al. Upregulation of the amino acid transporter ATB0,+ (SLC6A14) in colorectal cancer and metastasis in humans. *Biochim Biophys Acta* 2005;1741:215–23.
- [11] Gupta N, Prasad PD, Ghamande S, et al. Up-regulation of the amino acid transporter ATB(0,+) (SLC6A14) in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 2006;100:8–13.
- [12] Karunakaran S, Umapathy NS, Thangaraju M, et al. Interaction of tryptophan derivatives with SLC6A14 (ATB0,+) reveals the potential of the transporter as a drug target for cancer chemotherapy. *Biochem J* 2008;414:343–55.
- [13] Eriksson A, Jennische E, Flach CF, et al. quantification analysis of five mucosal transcripts in patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:2906.
- [14] Wang H, Ji Y, Wu G, et al. L-Tryptophan activates mammalian target of rapamycin and enhances expression of tight junction proteins in intestinal porcine epithelial cells. *J Nutr* 2015;145:1156–62.
- [15] Ruffin M, Volland M, Marie S, et al. Anoctamin 1 dysregulation alters bronchial epithelial repair in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832:2340–51.
- [16] Trinh NT, Bardou O, Prive A, et al. Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. *Eur Respir J* 2012;40:1390–400.

b. Update on SLC6A14 in lung and gastrointestinal physiology and pathophysiology: focus on cystic fibrosis

1. Résumé

La protéine SLC6A14 (solute carrier family 6 member 14) importe et concentre tous les acides aminés neutres ainsi que les deux acides cationiques lysine et arginine dans le cytoplasme de différents types de cellules. Principalement décrit comme étant impliqué dans plusieurs mécanismes physiopathologiques de cancers et de maladies coliques, le gène SLC6A14 a été plus récemment identifié comme un gène modificateur de la sévérité de la mucoviscidose. Pléiotrope, il module l'apparition de l'iléus méconial, la gravité de la maladie pulmonaire et la précocité de l'infection des voies respiratoires par P. aeruginosa. Les mécanismes biologiques expliquant l'impact de SLC6A14 sur les phénotypes intestinaux et pulmonaires des patients CF commencent à être élucidés. Cette revue se concentre sur le rôle de SLC6A14 dans la physiologie et la physiopathologie pulmonaire et gastro-intestinale, et plus particulièrement dans le contexte de la mucoviscidose.

Revue publiée en tant que co-première auteure dans le journal *Cellular and Molecular Life Sciences* en Septembre 2020.

2. Article

Cellular and Molecular Life Sciences (2020) 77:3311–3323
<https://doi.org/10.1007/s00018-020-03487-x>

Cellular and Molecular Life Sciences

REVIEW



Update on SLC6A14 in lung and gastrointestinal physiology and physiopathology: focus on cystic fibrosis

Manon Ruffin¹ · Julia Mercier¹ · Claire Calmel¹ · Julie Mésinèle¹ · Jeanne Bigot¹ · Erika N. Sutanto^{2,3} · Anthony Kicic^{2,3,4,5} · Harriet Corvol^{1,6} · Loïc Guillot¹

Received: 28 November 2019 / Revised: 24 January 2020 / Accepted: 17 February 2020 / Published online: 12 March 2020
 © The Author(s) 2020

Abstract

The solute carrier family 6 member 14 (SLC6A14) protein imports and concentrates all neutral amino acids as well as the two cationic acids lysine and arginine into the cytoplasm of different cell types. Primarily described as involved in several cancer and colonic diseases physiopathological mechanisms, the *SLC6A14* gene has been more recently identified as a genetic modifier of cystic fibrosis (CF) disease severity. It was indeed shown to have a pleiotropic effect, modulating meconium ileus occurrence, lung disease severity, and precocity of *P. aeruginosa* airway infection. The biological mechanisms explaining the impact of SLC6A14 on intestinal and lung phenotypes of CF patients are starting to be elucidated. This review focuses on SLC6A14 in lung and gastrointestinal physiology and physiopathology, especially its involvement in the pathophysiology of CF disease.

Keywords ATB^{0,+} · Amino acid transporter · CFTR · Nitric oxide · Pulmonary · Intestine

Introduction

Cystic fibrosis (CF), the most common lethal autosomal recessive genetic disease in Caucasians, is caused by variants in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane

conductance regulator (*CFTR*), a chloride channel expressed ubiquitously within epithelia [1–3].

Symptoms can occur as early as birth with meconium ileus (MI), a severe neonatal intestinal obstruction affecting around 15% of CF neonates. This is followed by manifestations of the disease in other organs such as the liver, the pancreas, and the intestine, with lung complications as the main cause of morbidity and mortality in CF patients. In the lungs, absence or dysfunction of CFTR proteins results in altered salt and water transport through the airway epithelium leading to an altered mucociliary clearance, progressive colonization with different pathogens, exacerbation of inflammation, and lung tissue damage. Among the multitude of pathogens colonizing the CF lungs, *Pseudomonas aeruginosa* is the most common and life-threatening pathogen. Indeed, *P. aeruginosa* chronic lung colonization has been associated with a more severe lung disease and reduced survival [4].

Although CF is a monogenic disease, considerable phenotypic diversity is observed in patients carrying identical *CFTR* variants [5–7]. In addition to environmental factors, twins and siblings' studies have revealed that genetic modifiers outside the *CFTR* locus are involved in this interindividual variability [5]. It is expected that these modifier genes account for 50% of the lung function variation. The current

Manon Ruffin and Julia Mercier have contributed equally to this work as co-first authors.

✉ Harriet Corvol
harriet.corvol@aphp.fr

- ¹ Sorbonne Université, INSERM UMR S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris, France
- ² Telethon Kids Institute, University of Western Australia, Nedlands, WA, Australia
- ³ School of Public Health, Curtin University, Bentley, WA, Australia
- ⁴ Centre for Cell Therapy and Regenerative Medicine, Medical School, The University of Western Australia, Nedlands, WA, Australia
- ⁵ Department of Respiratory and Sleep Medicine, Perth Children's Hospital, Nedlands, WA, Australia
- ⁶ Pneumologie Pédiatrique, APHP, Hôpital Trousseau, Paris, France

Springer

challenge is to identify these variants and determine how they contribute to the severity of the disease by performing *in vitro/in vivo* functional studies. Among the several modifier genes identified thus far, the solute carrier family 6 member 14 (*SLC6A14*, also known as *ATB⁰⁺*) has been shown to have pleiotropic effect in CF [8–14]. It was first identified as a modifier of MI occurrence [14], and then associated with lung disease and age at first *P. aeruginosa* infection [8, 10]. *SLC6A14*, the protein encoded by this gene, belongs to the solute carrier family 6 and uses the energy provided by Na⁺ and Cl⁻ gradients to import and concentrate all neutral amino acids as well as the two cationic acids lysine and arginine into the cytoplasm of different cell types. Besides the genotype/phenotype associations, the biological mechanisms explaining the impact of *SLC6A14* on intestinal and lung phenotypes of CF patients are beginning to be elucidated as evidenced by recent studies [15–17]. This review focuses on *SLC6A14* in the context of CF, especially its involvement in the pathophysiology of CF lung and gastrointestinal disease.

***SLC6A14* expression and regulation in the lung and gastrointestinal tract**

SLC6A14 gene is located on chromosome X and was cloned in 1999 from a mammary gland cDNA library [18]. This gene produces two transcripts (ENST00000598581.3 and ENST00000463626.1) but only one codes for a protein (ENSG00000087916.7) which is comprised of 642 amino acids with an expected molecular weight of 72 kDa. *SLC6A14* is a plasma membrane protein belonging to the solute carrier 6 (SLC6) family which contains 21 human proteins based on the similarity in their amino acid sequences [19]. Although no structural studies have been conducted on *SLC6A14* specifically, crystal structure and structural studies on others members of the SLC6 family, as well as topological domain analysis (<https://uniprot.org/uniprot/Q9UN76>) suggest that *SLC6A14* N- and C-terminal domains are cytoplasmic and that the sequence includes 12 putative transmembrane domains and 1 large extracellular domain between transmembrane domains 3 and 4 [19]. In the endoplasmic reticulum, the quality control of *SLC6A14* folding involves interactions with the heat shock proteins HSP70 and HSP90 [20]. *SLC6A14* trafficking from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus depends on its interaction with the cargo-recognizing protein SEC24 isoform C and the coatomer II (COPII) complex [21]. Further studies are needed to fully understand the mechanisms allowing *SLC6A14* trafficking to the plasma membrane.

SLC6A14 mRNA was initially shown to be expressed mainly in the lung, fetal lung, trachea, and salivary gland [18]. Microarray and RNA-sequencing data obtained from Expression Atlas public resource confirm that *SLC6A14*

is predominantly expressed in human and mouse lung tissue (Table 1). However, *SLC6A14* is also detected albeit in extremely low levels in gastrointestinal tissues including intestine and colon.

***SLC6A14* expression and regulation in the lung**

Before *SLC6A14* mRNA and protein were identified in the human lung, Galiotta et al. demonstrated the presence of a Na⁺-dependent amino acid transport at the apical membrane of bronchial epithelial cells isolated from CF or non-CF subjects [32]. Upon showing that *SLC6A14* mRNA was strongly expressed in the human lung and trachea compared to other organs [18], Sloan et al. also showed that *SLC6A14* protein was expressed in membrane fractions of human airway and distal lung samples from normal, emphysema, and CF patients [33]. Interestingly, the authors pointed out differences in the molecular mass of *SLC6A14* protein detected either in the airways or in the distal lung, which was due to alternative splicing or posttranslational modification. Several studies have also shown expression of *SLC6A14* in various cell lines of either airway or distal epithelial cell origin, as well as in primary bronchial epithelial cells (Table 2). In the alveolar A549 cell line, *SLC6A14* protein was either detected or absent according to the study considered [34, 35]. Di Paola et al. observed that primary cells from individuals with CF or healthy donors showed a similar mRNA level for *SLC6A14* [17], suggesting that *CFTR* pathogenic variants had no impact on *SLC6A14* mRNA expression. Interestingly, a recent study using single RNA sequencing revealed that *SLC6A14* expression was reduced in alveolar type II cells from idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients compared to controls [36]. Via single-cell analysis, the authors also showed that *SLC6A14* was expressed in basal, club cells, and alveolar type 2 cells.

In vitro, Gorrieri et al. observed that *SLC6A14* transcripts were enhanced in bronchial epithelial cells exposed to interleukin-4 [39]. In the human glandular bronchial epithelial cell line Calu-3 and in primary human bronchial epithelial cells, flagellin or lipopolysaccharide from *P. aeruginosa* exposures increase the expression of *SLC6A14* mRNA [17]. Finally, in relation to CF, a study using HEK-293 cells overexpressing *SLC6A14* showed that *SLC6A14* protein expression was reduced by suprapharmacological concentrations of Vx-770, a *CFTR* potentiator [40].

***SLC6A14* expression and regulation in the gastrointestinal tract**

In the human gastrointestinal tract, *SLC6A14* appears to be heterogeneously expressed (Table 3). Sloan et al. first detected *SLC6A14* mRNA in the stomach, although its levels were significantly lower than those observed in lung samples

Table 1 SLC6A14 transcript expression in human (A) and mouse (B) (Modified from: Expression Atlas; <https://www.ebi.ac.uk>)

Study		Human (A)																	Mouse (B)																	Associated references
		Lung	Salivary glands	Stomach	Vermiform appendix	Breast	Lower leg skin	Prostate gland	Urinary bladder	Vagina	Skin	Gall bladder	Duodenum	Esophagus	Esophagus mucosa	Pituitary gland	Tonsil	Small intestine	Rectum	Large intestine	Fallopian tube	Colon	Kidney	Sex	Age											
RNA-seq of coding RNA of 19 human tissues from fetuses with congenital defects (NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium)				0														1	1					1	mixed	fetuses	[23]									
RNA-seq of coding RNA from tissue samples of 122 human individuals representing 32 different tissues (Uhlen's Lab)		63	28	11	7			4	6		4	3	2	2			2	1	1	1	1	0	0	0	N/A	adult	N/A									
Strand-specific RNA-seq of 13 human tissues (Michael Snyder's lab for the ENCODE project)		42																0					0	mixed	adult	[24]										
Illumina Body Map		23				6		2														0	0	N/A	N/A	[25-27]										
RNA-seq from 53 human tissue samples (Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project)		14	30	0		1	6	1	0	5	5						2	2				0	0	mixed	N/A	[28]										
Study		Human (A)																	Mouse (B)																	Associated references
		Lung	Testis	Vomerinal organ	Olfactory epithelium	Skin	Kidney	Thymus	Strain	Sex	Age																									
RNA-seq of the olfactory system of newborn mice				35	32																			mixed	newborn	N/A										
RNA-seq of mouse DBA/2J x C57BL/6J		124										0.5												N/A	adult	[29]										
Mammalian Kaessmann			3								0.6													mixed	adult	[30]										
RNA-seq of 9 tissues from an adult male C57BL/6 mouse		81	6					21			0												male	adult	[31]											
Transcription profiling by high throughput sequencing of mouse brain, liver and the whole testis (Saunillon et al.)			3																					male	adult	[32]										
Strand-specific RNA-seq of nine mouse tissues		87	4								0												N/A	N/A	N/A	N/A										
Strand-specific RNA-seq of nine mouse tissues		77	3								0												N/A	N/A	N/A	N/A										
Strand-specific RNA-seq of nine mouse tissues		58	3								0												N/A	N/A	N/A	N/A										

Numbers refer as transcripts per million, the gradation of blue illustrates the abundance of the transcript SLC6A14

Table 2 Expression of SLC6A14 at the mRNA and protein levels in the human respiratory tract

Sample	Tissue/cell types	mRNA	Protein	Ref
Tissues	Lung tissue samples		Expressed (WB)	[33]
Cell lines	Calu-3	Expressed (qPCR)	–	[37]
	NCI-H69	Expressed (qPCR)	–	[38]
	A549, BEAS-2B	Barely detectable (qPCR)	Undetected (WB)	[34]
	Calu-3, NCI-H441	Expressed (qPCR)	Expressed (WB)	[34]
	Calu-3, CFBE41o-	Expressed (qPCR)	–	[17]
	A549	–	Expressed (WB)	[35]
Primary cells	Alveolar type 2 cells isolated from control and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) lung tissue	Expressed. Reduced in IPF cells (scRNAseq, qPCR)	–	[36]
	Bronchial epithelial cells isolated from posttransplant tissue from healthy donors and CF patients	Expressed (qPCR)	–	[17]

Calu-3 human lung adenocarcinoma cell line, *NCI-H69* and *A549* human lung carcinoma cell line, *BEAS-2B* human bronchial epithelial cell line from a normal subject, *NCI-H441* human lung papillary adenocarcinoma cell line, *CFBE41o-* human cystic fibrosis bronchial epithelial cell line, – not studied, *qPCR* quantitative polymerase chain reaction, *WB* Western blot

Table 3 Expression of SLC6A14 at the mRNA and protein level in human gastrointestinal tract

Sample	Tissues/cell types	mRNA	Protein	Ref
Tissues	Intestinal epithelium (cholera patients)	Expressed	Expressed (IHC)	[42]
	Gastrointestinal tissues	Expressed	–	[43, 46]
Cell lines	Caco-2	Expressed	–	[42]
		Undetectable	–	[43]
		–	Expressed (WB & IF)	[44]
		Not expressed (PCR)	Not expressed (WB)	[16]
		–	Expressed (WB)	[44]
	CCD841, HCT116, HT29, LS174T	–	Expressed (WB)	[44]

Caco-2, *HT29* and *LS174T* human adenocarcinoma colorectal epithelial cell lines, *CCD841* normal human colon epithelial cell line, *HCT116* human colon epithelial cell line from colorectal carcinoma, *HT29* and *LS174T* human epithelial cell lines from colon adenocarcinoma (– not studied, *WB* Western blot, *IF* immunofluorescence, *IHC* immunohistochemistry)

[18]. Two studies then detected *SLC6A14* transcripts in mucosal biopsies from duodenum and rectum, respectively [41, 42]. Finally, Anderson et al. compared the expression of *SLC6A14* mRNA throughout the gastrointestinal tract and showed that stomach, duodenum, and descending colon expressed high levels of *SLC6A14* transcripts, while low levels were found in jejunum, ileum, ascending colon, and transverse colon [43]. Conflicting results have been obtained on the expression of *SLC6A14* in the human colon epithelial cell line Caco-2, reporting either some or no *SLC6A14* transcripts or protein [16, 42–44]. Interestingly, in mice, *SLC6A14* mRNA expression is negligible in the ileum of control animals, but is strongly induced in epithelial ileal cells of CF mice [45].

In vitro, it has been showed that *SLC6A14* expression may be modulated by several factors including toxins, bacterial constituents, and proinflammatory cytokines. Indeed,

Flach et al. showed that *SLC6A14* mRNA levels are significantly increased after 18 h of stimulation with cholera toxin in Caco-2 cells [42]. Other molecules have also been shown to regulate *SLC6A14* expression. For example, in porcine intestinal cells, Wang et al. showed that *SLC6A14* mRNA was increased by L-tryptophan [47]. Ikpa et al. also showed that antibiotic treatment of CF mice induces an important reduction of *SLC6A14* transcripts in ileal epithelial cells [45].

Genetic association studies in CF

Given the diversity of phenotypic severity in CF patients with the same causal *CFTR* variants, several genetic studies have been conducted to identify CF modifier genes. Among the identified loci, one locus on chromosome X, near the

Table 4 Genetic associations tested between *SLC6A14* variants and digestive and pulmonary manifestations in CF patients

rs ID (Alleles)	MAF	Variant localization	Association with	Number of CF patients	Cohort/patients characteristics	Ref
rs7879546 (T/C)	0.41	Intergenic	Lung disease severity	6365	Mean age: 19.5 years; PI (99.8%); F508del homozygotes (65%)	[8]
rs5905376 (C/A)	0.23	Intergenic	Lung disease severity			
rs5952223 (C/T)	0.23	Intergenic	Lung disease severity			
rs12839137 (G/A)	0.12	Intergenic	Presence of meconium ileus	6135	Two independent cohorts (patients with two severe <i>CFTR</i> mutations): 3,763 North American (F508del homozygotes 71.4%) and 2,372 French (> 6 years old) and American patients	[14]
			No association with pediatric lung disease severity	815	Mean age of lung function measurements: 12.63 years; F508del homozygotes: 62.3%	[10]
			No association with age of first infection by <i>P. aeruginosa</i>	730	Median age at first detection of positive <i>P. aeruginosa</i> culture: 5.55 years; F508del homozygotes: 61%	
			No association with early exocrine pancreatic disease	126	Median age of the first available IRT measurement: 0.36 years; F508del homozygotes: 60.3%	
			No association with early exocrine pancreatic damage	111	Patients from Colorado, median age at IRT measurement: 2 days; F508del homozygotes: 56%	[11]
rs5905283 (A/C)	0.47	Intergenic (2 KB Upstream Variant)	Presence of meconium ileus	6,135	Two independent cohorts (patients with two severe <i>CFTR</i> mutations): 3,763 North American (F508del homozygotes 71.4%) and 2,372 French (> 6 years old) and American patients	[14]
			Pediatric lung disease severity	815	Mean age of lung function measurements: 12.63 years; F508del homozygotes: 62.3%	[10]
			No association with age of first infection by <i>P. aeruginosa</i>	730	Median age at first detection of positive <i>P. aeruginosa</i> culture: 5.55 years; F508del homozygotes: 61%	
			No association with early exocrine pancreatic phenotypes	126	Median age of the first available IRT measurement: 0.36 years; F508del homozygotes: 60.3%	
			No association with early exocrine pancreatic damage	111	Patients from Colorado, median age at IRT measurement: 2 days; F508del homozygotes: 56%	[11]
rs3788766 (G/A)	0.36	Regulatory region	Presence of meconium ileus	6,135	Two independent cohorts (patients with two severe <i>CFTR</i> mutations): 3,763 North American (F508del homozygotes 71.4%) and 2,372 French (> 6 years old) and American patients	[14]
			Pediatric lung disease severity	815	Mean age of lung function measurements: 12.63 years; F508del homozygotes: 62.3%	[10]
			Age of first infection by <i>P. aeruginosa</i>	730	Median age at first detection of positive <i>P. aeruginosa</i> culture: 5.55 years; F508del homozygotes: 61%	
			No association with early exocrine pancreatic phenotypes	126	Median age of the first available IRT measurement: 0.36 years; F508del homozygotes: 60.3%	
			No association with early exocrine pancreatic damage	111	Patients from Colorado, median age at IRT measurement: 2 days; F508del homozygotes: 56%	[11]
			Early pulmonary symptoms	79	Brazilian patients	[12]
			<i>P. aeruginosa</i> infection	83		
			Presence of meconium ileus	6,770	Patients with two severe <i>CFTR</i> mutations associated with PI; F508del homozygotes: 64.2%	[9]
rs12710568 (G/C)	0.31	Regulatory region	Presence of meconium ileus	6,770	Patients with two severe <i>CFTR</i> mutations associated with PI; F508del homozygotes: 64.2%	[9]
rs5905177 (C/T)	0.35	<i>SLC6A14</i> intron	Presence of meconium ileus			

Chromosomal position (forward strand); minor allele in the European population, Minor allele Frequency (MAF), data were collected from Ensembl, 1000 Genomes, European population. *IRT* immunoreactive trypsinogen, *PI* pancreatic insufficiency

SLC6A14 gene, was associated with a variability in the severity of CF clinical manifestations including lung disease severity/pulmonary infections or presence of MI/onset of digestive symptoms (Table 4). Linkage disequilibrium pattern of the different genetic variants studies in this review is shown in Fig. 1.

The initial evidence showing that *SLC6A14* may be a modifier gene in CF has been described by Sun et al. in a “genome wide association study” (GWAS) involving 6135 CF patients [14]. This study identified a significant association between susceptibility to MI and three *SLC6A14* genetic variants (rs12839137, rs5905283, and rs3788766).

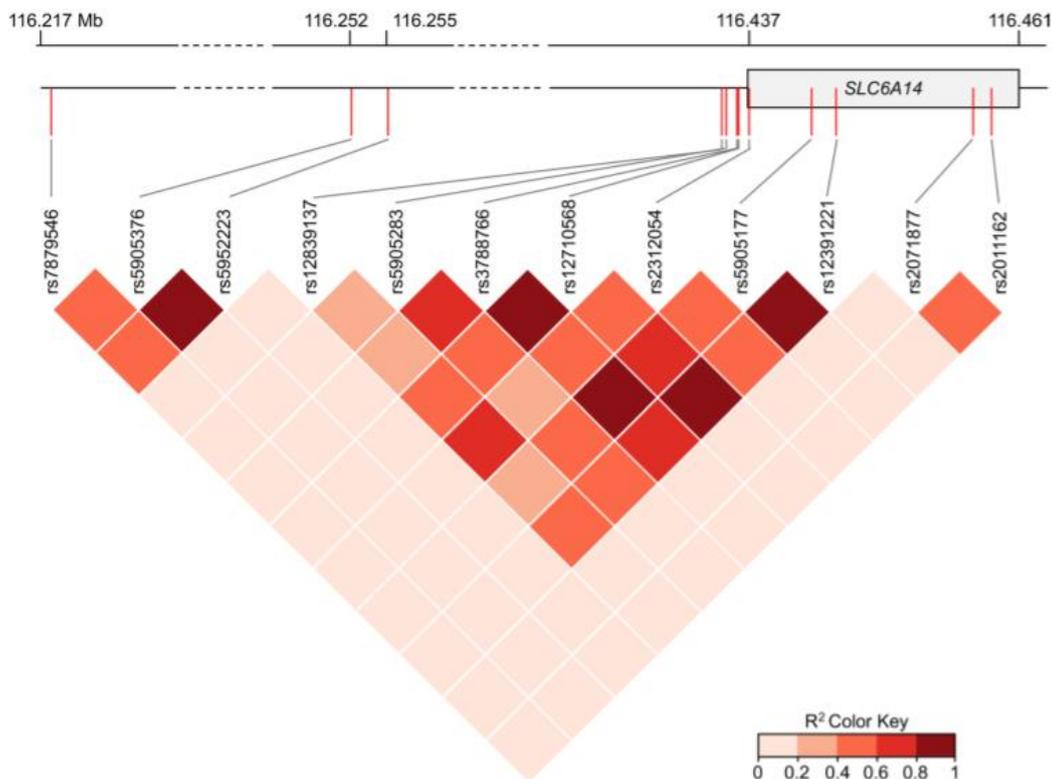


Fig. 1 Linkage disequilibrium (LD) pattern of the twelve *SLC6A14* genetic variants studied. The dark red squares indicate pairs in strong LD. R^2 are from <https://ldlink.nci.nih.gov>

In a study involving more than 6700 CF patients from the International CF Gene Modifier Consortium, Gong et al. recently replicated the association between susceptibility to MI and rs3788766 [9]. This study also identified an association between MI susceptibility and two new variants (rs12710568 and rs5905177) located within the *SLC6A14* regulatory region and *SLC6A14* intron, respectively. Several groups performed sex-specific association analysis based on the fact that *SLC6A14* gene is located within the region associated with random X-inactivation [9, 14]. Interestingly, they found higher odd ratios in male than in female only for genetic variants associated with susceptibility to MI.

Li et al. further assessed the association of MI risk alleles of *SLC6A14* with other CF co-morbidities, such as the lung disease severity and age at first *P. aeruginosa* infection [10]. Their study involved 815 CF Canadian pediatric patients who were genotyped for the following *SLC6A14* variants: rs12839137, rs5905283, and rs3788766. Among the variants studied, rs5905283 and rs3788766 risk alleles were associated with pediatric lung disease severity; whilst rs3788766 variant was associated with age at first *P. aeruginosa*

infection, as confirmed later in a smaller cohort [12]. In 2015, a GWAS involving 6,365 patients confirmed that *SLC6A14* modifies the severity of the lung disease in CF [8]. Indeed, the authors found a significant association between genotypes of three *SLC6A14* intergenic variants (rs7879546, rs5905376, and rs5952223) and the lung disease severity.

Gong et al. recently integrated GWAS and tissue-specific gene expression data to determine whether modifier loci on chromosome X (encompassing *SLC6A14*) influence *SLC6A14* mRNA expression levels in different tissues [9]. This kind of analysis indicates whether eQTL (expression quantitative trait loci) colocalize with loci associated with CF phenotypes that may indicate the existence of a genetic regulator. Their results showed that *SLC6A14* mRNA expression in CF nasal epithelia and in the pancreas colocalize with the lung disease and MI-associated variants, respectively, suggesting that each locus impacts *SLC6A14* expression with tissue specificity. Besides, neither association between *SLC6A14* genetic variants and early exocrine pancreatic phenotype nor immunoreactive trypsin levels at birth have been found [10, 11].

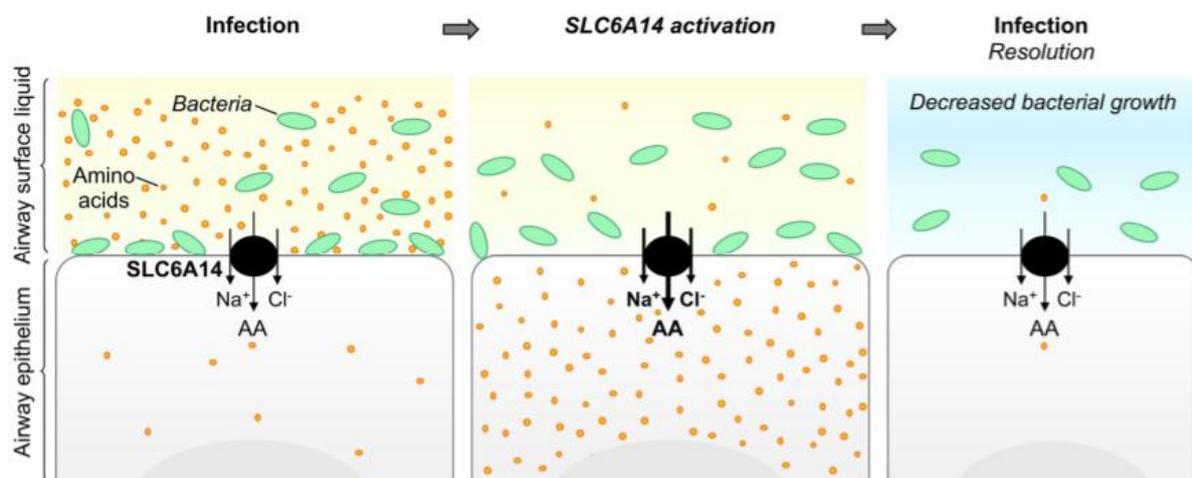


Fig. 2 Proposed mechanism of the role of SLC6A14 in the host response against *P. aeruginosa*. AA amino acids, Na^+ sodium ions, Cl^- chloride ions

Putative biological roles of SLC6A14 in CF

Several studies showed that SLC6A14 plays a primary role as an amino acid transporter in various epithelial cells and models [32, 48–52]. Taken together, SLC6A14 expression data in human and genetic studies suggest that SLC6A14 may have an important role in the lung and intestinal pathophysiology of CF patients (see Parts 1 and 2).

SLC6A14 function in the lung

In the lung, it was first suggested that the apical transport of amino acid in the airway epithelial cells may play an important role in infection resolution [32] as pathogens need amino acids to proliferate into the airways. The authors suggested that amino acid transporter at the apical membrane may be activated following infection to rapidly decrease the amino acid concentration of the airway surface liquid (ASL) (Fig. 2). This phenomenon could then help to fight against infections. This hypothesis is supported by the unique characteristics of SLC6A14 allowing it to strongly concentrate all essential amino acids into the cytoplasm of epithelial cells.

As *SLC6A14* genetic variants have been associated with age at first acquisition of *P. aeruginosa* in CF patients, Di Paola et al. sought to determine how SLC6A14 might impact the airways colonization by these bacteria [17]. They suggested that exposure to *P. aeruginosa* increased *SLC6A14* mRNA expression, inducing a decrease in amino acid concentration in the ASL that resulted in a decrease in *P. aeruginosa* attachment to the airway epithelial cells rather than a reduced viability of planktonic *P. aeruginosa*. Indeed, they

found that purified flagellin from *P. aeruginosa* enhanced *SLC6A14* mRNA expression and SLC6A14-dependent arginine import in Calu-3 cells and in primary airway epithelial cells from non-CF and CF patients. Moreover, they showed that pharmacological inhibition of SLC6A14 increased *P. aeruginosa* attachment in non-CF primary airway epithelial cells and slightly in the bronchial epithelial cell line CFBE41o-.

Ahmadi et al. recently reported that arginine transport through SLC6A14 increased F508del-CFTR Cl^- efflux in CF airway epithelial cells stimulated with or without a CFTR corrector, lumacaftor [15]. They also observed that this increase in CFTR function induced an increase in the ASL height and that the potentiation of F508del-CFTR channel function in CF cells induced by SLC6A14 arginine uptake occurred via the nitric oxide (NO) signaling pathway (Fig. 3). Finally, they suggested that SLC6A14 activation may be considered as a complement therapy to CFTR correction and potentiation in CF patients.

SLC6A14 function in the gastrointestinal tract

Ahmadi et al. also conducted another study to determine the biological function of SLC6A14 in the murine gastrointestinal tract [16]. They first demonstrated that SLC6A14 is a major apical amino acid transporter in the murine colon. Indeed, *Slc6a14(-/-)* mice exhibited almost 75% reduction in apical arginine transport compared to WT mice. In CF mice, they observed that *Slc6a14* disruption induced a reduction in weight gain and BMI post-weaning and worsen the intestinal phenotype, i.e., decreased F508del-CFTR-mediated fluid secretion. They also highlighted that SLC6A14 does not seem to affect

Fig. 3 Relationships between SLC6A14, F508del-CFTR, and nitric oxide signaling pathway. *CF* cystic fibrosis, *ASL* airway surface liquid, *AA* amino acids, Na^+ sodium ions, Cl^- chloride ions, HCO_3^- bicarbonate ions, *iNOS* inducible NO synthetase, *NO* nitric oxide

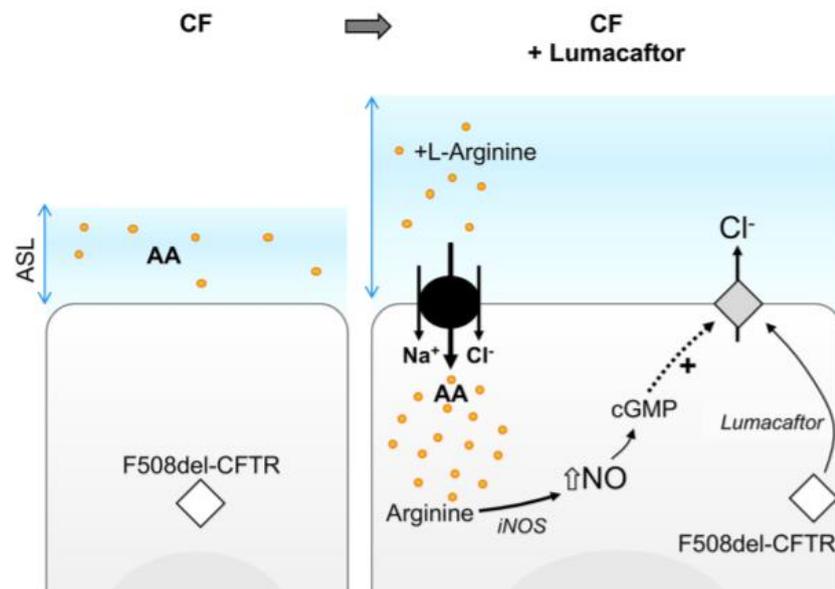


Table 5 Expression of SLC6A14 in other diseases

Disease	SLC6A14 expression	Methods	Ref	
Cancer	Cervical	Up-regulated	PCR, IF/IH, HIS	[54]
	Colorectal	Up-regulated	PCR, Northern blot, IH	[55]
	Pancreatic	Up-regulated	Microarray, qPCR, WB, IF, IH	[56, 57]
	Breast (ER+)	Up-regulated	PCR, IF	[58]
Colonic diseases	Crohn's disease	Up-regulated	qPCR	[46]
	Ulcerative colitis	Up-regulated	qPCR, microarray	[41, 59, 60]
	Long vs. short duration of ulcerative colitis	Down-regulated	Microarray	[61]
	Ischemic or infectious colitis	Up-regulated	qPCR	[60]
Cholera	Acute vs. convalescence phase	Up-regulated	Microarray, qPCR, IH	[42]
IPF	IPF	Down-regulated	scRNAseq	[36]
	IPF vs. NSIP	Up-regulated	Microarray	[62]

ER+ estrogen receptor-positive, *IPF* idiopathic pulmonary fibrosis, *NSIP* non-specific interstitial pneumonia. If not specifically mentioned, the expression of SLC6A14 is relative to control patients. *IF* immunofluorescence, *IH* immunohistochemistry, *HIS* hybridization in situ, *PCR* polymerase chain reaction, *WB* western blot

the processing or stability of F508del-CFTR neither co-immunoprecipitated with F508del-CFTR in an F508del-CFTR BHK over-expression system, which led them to investigate intracellular signaling such as NO synthesis. They observed that SLC6A14 inhibition impaired arginine uptake by intestinal epithelial cells inducing both a decrease in NO production and cGMP regulation of F508del-CFTR. These results suggest that an increase in SLC6A14 activity may enhance NO production and F508del-CFTR residual activity in CF tissues. However,

it is not known whether these mechanisms are conserved in humans.

It has to be emphasized that in the lung or the intestine, functional studies were conducted with either over-expression (plasmid) or inhibition experiments (siRNA) of the whole gene. The role of the specific genetic variants identified in genetic studies (see Part entitled "Genetic association studies in CF") is not yet known and further elucidation is warranted.

Table 6 Genetic associations tested between *SLC6A14* variants and diseases

rs ID (alleles)	MAF	Variant localization	Association with	Number of patients/cohort characteristics	Ref
rs2312054 (A/T)	0.21	<i>SLC6A14</i> intron	Food intake	344 children, age 7–8 years	[70]
rs12391221 (C/A)	0.30	<i>SLC6A14</i> intron	Food intake	344 children, age 7–8 years	[70]
rs2071877 (C/T)	0.30	<i>SLC6A14</i> intron	Obesity	1267 obese adults and 649 lean controls (French)	[71]
rs2011162 (C/G)	0.45	<i>SLC6A14</i> exon 14; 3'UTR	Adiposity	344 children, age 7–8 years	[70]
			Obesity	Two independent cohorts: 117 obese and 182 controls (Finnish); 837 obese and 968 controls (Finnish and Swedish)	[72]
			Obesity	1267 obese adults and 649 lean controls (French)	[71]
			Reduced fat oxidation in women	722 obese subjects of white European origin (541 women, 181 men), age 20–25 years	[73]
			Male infertility	370 infertile men and 241 fertile controls (Macedonian and Slovenian)	[74]
rs2312054(A)/rs2071877(C)/rs2011162(G) haplotype			Male infertility	370 infertile men and 241 fertile controls (Macedonian and Slovenian)	[74]

Chromosomal position (forward strand); Alleles (Minor), Minor allele Frequency (MAF), data were collected from Ensembl, 1000 Genomes, European population

SLC6A14 in non-CF diseases

SLC6A14 expression in other diseases

SLC6A14 expression has been shown to be differentially up-regulated in several pathological contexts (Table 5), especially in cancer and colonic diseases (reviewed in [53]).

Cancer

SLC6A14 is significantly upregulated in tissues from cervical [54], colorectal [55], pancreatic [56, 57], and estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer [58]. In ER+ breast cancer, high expression of *SLC6A14* mRNA has been correlated with a better survival among patients [63]. Using a mouse model of spontaneous breast cancer, Babu et al. showed that its development and progression was significantly decreased when the mice were crossed with *Slc6a14*^{-/-} mice [64]. The molecular mechanisms associated with these up- or down-regulations are largely unknown. SLC6A14 expression was shown to be regulated by estrogen [58] which explains its specific increased expression in ER+ but not in ER- breast cancer. Also, inverse expression patterns of *SLC6A14* mRNA and the microRNA (miR)-23a [65, 66] were found suggesting its regulatory effect. However, no functional studies (using miR mimic or inhibitors) confirmed miR-23a involvement in *SLC6A14* expression regulation. In contrast, inverse correlation of miR-23b-3p [67] and *SLC6A14* expression was recently confirmed. Functional studies have shown that the downregulation of SLC6A14 observed in endocrine therapy (ER + breast cancer standard

of care)-resistant cells is associated with an increase of miR-23b-3p [63].

Colonic diseases

SLC6A14 mRNA levels are significantly higher in colonic mucosal specimens obtained from patients with Crohn's disease compared to controls [46]. *SLC6A14* expression was also increased in rectal and colonic biopsies from patients with ulcerative colitis or infectious/ischemic colitis compared to controls, suggesting that *SLC6A14* upregulation might be the result of the inflammatory context rather than a specific pathophysiological consequence of the ulcerative colitis [41, 59, 60, 68]. Low et al. further observed that *SLC6A14* was down-regulated in colonic biopsies from patients with long-duration of ulcerative colitis compared with patients with short duration [61]. In rats, D'Argenio et al. showed that experimental colitis induced a marked decrease in *SLC6A14* transcript expression in the colon [69]. Finally, Kou et al. found that colon cancer cell lines overexpressed SLC6A14 compared to normal colon cells [44].

Idiopathic pulmonary fibrosis

SLC6A14 has been found to be downregulated in alveolar-type II cells of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients [36], while it is overexpressed in specimens from explanted lungs of patients with non-specific interstitial pneumonia compared to specimens from IPF patients [62].

Infectious diseases

SLC6A14 mRNA levels have been shown to be increased in biopsies of duodenum collected during the acute phase of cholera compared to biopsies collected during convalescence phase [42].

Genetic associations studies in other diseases

Four additional *SLC6A14* genetic variants have been associated with phenotypic variability in other diseases than CF (Table 6).

SLC6A14 genetic variants have been associated with obesity in different populations (Table 6). In a candidate gene analysis, later replicated in an independent cohort, Suviolahti et al. found significant differences in *SLC6A14* rs2011162 genetic variant allele frequencies between obese and non-obese subjects [72]. Another study suggested an association between the rs2011162 and fat oxidation in women which may be, when not adapted to fat intake, responsible to weight gain over time [73]. Finally, in a French family cohort study comprising of 1,267 obese adults and 649 lean control subjects, Durand et al. found a significant association between rs2011162 genetic variant and obesity. They observed that the risk allele was associated with higher body fat and modified perception of hunger and satiety in adult women with moderate obesity and in obese girls [71]. Durand et al. also identified an association between *SLC6A14* rs2071877 genetic variant and obesity in a French cohort [71]. This variant has also been associated with sum of triceps and subscapular skinfolds thickness, an objective measure of adi-

posity, in boys 7–8 of age [70]. Finally, Miranda et al. also found evidences of associations between two other genetic variants, rs2312054 and rs12391221, and several parameters used to assess the food intake in children [70].

SLC6A14 genetic variants have been also associated with male infertility. Indeed, Noveski et al. found that rs2011162 alone and rs2011162(G)/rs2071877(C)/rs2312054(A) haplotype were differently distributed among fertile and infertile groups in their cohort [74]. As rs2011162 is located within the 3'UTR region of *SLC6A14*, they investigated the possible consequences of this genetic variation on the RNA secondary structure. They found a significant structural effect of this genetic variant that may result in a differential mRNA expression depending on the allele.

It was recently shown that *SLC6A14* expression quantitative trait loci (eQTL) from nasal epithelial cells and pancreas tissues coincide with lung disease and meconium ileus-associated variants, respectively, supporting an important role for *SLC6A14* variants in CF [9]. However, whether in CF or other diseases, the functional in vitro/in vivo consequences of identified *SLC6A14* genetic variants on *SLC6A14* protein expression and/or function have never been studied. This gap

in knowledge needs to be addressed to better understand the molecular mechanisms by which *SLC6A14* affect phenotypes or diseases. *SLC6A14* genetic variants described in this review are located in the non-coding region either intergenic or located in the regulatory region (promoter), introns, or in the 3'UTR region of *SLC6A14*, and, subsequently, do not modify the amino acid sequence of *SLC6A14* protein. However, these variants may have multiple effects not only on *SLC6A14*, but also on nearby and/or distant genes. For example, genetic variants located in the promoter may affect transcriptional activity by altering transcription factor binding. Other functional consequences of these SNPs have to be studied including DNA methylation and histone modifications, alternative splicing, conformation and stability of mRNA as well as structure, expression level, and function of proteins. Even if bioinformatic tools may predict functional consequences of genetic variants, downstream in vitro/in vivo experimental studies will also be necessary. Successfully used for several complex traits, genome-editing technologies may also be used to create isogenic cell lines with specific alleles to assess their functionality including chromatin structure, transcription factor binding, gene and protein expression, and specific cellular assays [75]. Furthermore, as previously mentioned, in addition to the impact of genetic variants, *SLC6A14* expression can be regulated by environmental factors (inflammatory molecules, pathogens, and pharmacological treatments) and possibly age (fetal vs. adult, Table 1). Thus, the development of different experimental models to identify the causality of *SLC6A14* expression and function variability over the course of disease progression will be a major challenge.

Conclusion

SLC6A14 seems to be predominantly expressed in epithelial cells of the human lung and to a lesser extent in the human gastrointestinal epithelium. Importantly, *SLC6A14* expression profiles appear to be different between human and mice, suggesting that studies investigating the biological roles of this protein in murine models may not directly correlate with findings obtained in human models. Several groups have observed that *SLC6A14* levels are up- or down-regulated in pathological conditions, however, the mechanisms involved in these dysregulations have mostly not been elucidated. Moreover, some studies have demonstrated that inflammatory mediators and pathogen molecules may impact *SLC6A14* expression.

Furthermore, genetic studies highlight that *SLC6A14* genetic variants modulate the severity of digestive and pulmonary diseases in CF patients. The biological function of this pleiotropic modifier gene is not fully explained and

the biological direct consequences of identified variants in genetic studies remained to be clarified. However, some recent studies suggest that SLC6A14 may play an important role in the response to respiratory infection and fluid secretion related to CFTR. Thus, SLC6A14 may be a potential therapeutic target to improve anti-infective response and CFTR function and/or correction in CF patients in a personalized way.

Acknowledgements The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project was supported by the Common Fund of the Office of the Director of the National Institutes of Health, and by NCI, NHGRI, NHLBI, NIDA, NIMH, and NINDS. The data described in this manuscript were obtained from the GTEx Portal on 12/18/2018.

Funding LG received a grant from the French cystic fibrosis non-profit organization Vaincre la mucoviscidose (RF20180502243) and a PHC (Programme Hubert Curien) PHC FASIC 2017. MR received a post-doctoral fellowship from the French cystic fibrosis non-profit organization Vaincre la mucoviscidose (RF20180502243).

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK et al (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245(4922):1073–1080. <https://doi.org/10.1126/science.2570460>
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R et al (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245(4922):1066–1073
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G et al (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245(4922):1059–1065. <https://doi.org/10.1126/science.2772657>
- Kerem E, Viviani L, Zolin A, MacNeill S, Hatziaorou E et al (2014) Factors associated with FEV1 decline in cystic fibrosis: analysis of the ECFS patient registry. *Eur Respir J* 43(1):125–133. <https://doi.org/10.1183/09031936.00166412>
- Cutting GR (2015) Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 16(1):45–56. <https://doi.org/10.1038/nrg3849>
- Guillot L, Beucher J, Tabary O, Le Rouzic P, Clement A et al (2014) Lung disease modifier genes in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 52:83–93. <https://doi.org/10.1016/j.bioce.2014.02.011>
- McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML (2003) Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* 361(9370):1671–1676. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13368-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13368-5)
- Corvol H, Blackman SM, Boelle PY, Gallins PJ, Pace RG et al (2015) Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nat Commun* 6:8382. <https://doi.org/10.1038/ncomms9382>
- Gong J, Wang F, Xiao B, Panjwani N, Lin F et al (2019) Genetic association and transcriptome integration identify contributing genes and tissues at cystic fibrosis modifier loci. *PLoS Genet* 15(2):e1008007. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008007>
- Li W, Soave D, Miller MR, Keenan K, Lin F et al (2014) Unraveling the complex genetic model for cystic fibrosis: pleiotropic effects of modifier genes on early cystic fibrosis-related morbidities. *Hum Genet* 133(2):151–161. <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1363-7>
- Miller MR, Soave D, Li W, Gong J, Pace RG et al (2015) Variants in solute carrier SLC26A9 modify prenatal exocrine pancreatic damage in cystic fibrosis. *J Pediatr* 166(5):1152–1157. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.01.044>
- Pereira SV, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Marson FAL (2017) Association of clinical severity of cystic fibrosis with variants in the SLC gene family (SLC6A14, SLC26A9, SLC11A1 and SLC9A3). *Gene* 629:117–126. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.068>
- Pereira SVN, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Marson FAL (2018) Interaction among variants in the SLC gene family (SLC6A14, SLC26A9, SLC11A1, and SLC9A3) and CFTR mutations with clinical markers of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 53(7):888–900. <https://doi.org/10.1002/ppul.24005>
- Sun L, Rommens JM, Corvol H, Li W, Li X et al (2012) Multiple apical plasma membrane constituents are associated with susceptibility to meconium ileus in individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet* 44(5):562–569. <https://doi.org/10.1038/ng.2221>
- Ahmadi S, Wu YS, Li M, Ip W, Lloyd-Kuzik A et al (2019) Augmentation of CFTR function in human bronchial epithelial cells via SLC6A14-dependent amino acid uptake: implications for treatment of cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2019-0094OC>
- Ahmadi S, Xia S, Wu YS, DiPaola M, Kissoon R et al (2018) SLC6A14, an amino acid transporter, modifies the primary CF defect in fluid secretion. *Elife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.37963>
- DiPaola M, Park AJ, Ahmadi S, Roach EJ, Wu YS et al (2017) SLC6A14 is a genetic modifier of cystic fibrosis that regulates *Pseudomonas aeruginosa* attachment to human bronchial epithelial cells. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mBio.02073-17>
- Sloan JL, Mager S (1999) Cloning and functional expression of a human Na(+) and Cl(-)-dependent neutral and cationic amino acid transporter B(0+). *J Biol Chem* 274(34):23740–23745. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.23740>
- Pramod AB, Foster J, Carvelli L, Henry LK (2013) SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Mol Aspects Med* 34(2–3):197–219. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.002>
- Rogala-Koziarska K, Samluk L (1866) Nalecz KA (2019) Amino acid transporter SLC6A14 depends on heat shock protein HSP90 in trafficking to the cell surface. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 10:1544–1555. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2019.07.009>
- Kovalchuk V, Samluk L, Juraszek B, Jurkiewicz-Trzaska D, Susic S et al (1866) (2019) Trafficking of the amino acid transporter B(0,+)(SLC6A14) to the plasma membrane involves an exclusive interaction with SEC24C for its exit from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2:252–263. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2018.11.005>
- Roadmap Epigenomics C, Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M et al (2015) Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* 518(7539):317–330. <https://doi.org/10.1038/nature14248>

23. Lin S, Lin Y, Nery JR, Ulrich MA, Breschi A et al (2014) Comparison of the transcriptional landscapes between human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(48):17224–17229. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413624111>
24. Asmann YW, Necela BM, Kalari KR, Hossain A, Baker TR et al (2012) Detection of redundant fusion transcripts as biomarkers or disease-specific therapeutic targets in breast cancer. *Cancer Res* 72(8):1921–1928. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3142>
25. Barbosa-Morais NL, Irimia M, Pan Q, Xiong HY, Gueroussov S et al (2012) The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. *Science* 338(6114):1587–1593. <https://doi.org/10.1126/science.1230612>
26. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S et al (2012) The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* 22(9):1775–1789. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>
27. Consortium GT (2015) Human genomics. The genotype-tissue expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science* 348(6235):648–660. <https://doi.org/10.1126/science.1262110>
28. Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, White MA, Wong K et al (2011) Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature* 477(7364):289–294. <https://doi.org/10.1038/nature10413>
29. Brawand D, Soumillon M, Necsulea A, Julien P, Csardi G et al (2011) The evolution of gene expression levels in mammalian organs. *Nature* 478(7369):343–348. <https://doi.org/10.1038/nature10532>
30. Huntley MA, Lou M, Goldstein LD, Lawrence M, Dijkgraaf GJ et al (2016) Complex regulation of ADAR-mediated RNA-editing across tissues. *BMC Genomics* 17:61. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2291-9>
31. Soumillon M, Necsulea A, Weier M, Brawand D, Zhang X et al (2013) Cellular source and mechanisms of high transcriptome complexity in the mammalian testis. *Cell Rep* 3(6):2179–2190. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.031>
32. Galletta LJ, Musante L, Romio L, Caruso U, Fantasia A et al (1998) An electrogenic amino acid transporter in the apical membrane of cultured human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 275(5):L917–923. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.275.5.L917>
33. Sloan JL, Grubb BR, Mager S (2003) Expression of the amino acid transporter ATB 0+ in lung: possible role in luminal protein removal. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(1):L39–49. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00164.2002>
34. Ingoglia F, Visigalli R, Rotoli BM, Barilli A, Riccardi B et al (2016) Functional activity of L-carnitine transporters in human airway epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2:210–219. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2015.11.013>
35. Luo Q, Yang B, Tao W, Li J, Kou L et al (2017) ATB(0,+) transporter-mediated targeting delivery to human lung cancer cells via aspartate-modified docetaxel-loading stealth liposomes. *Biomater Sci* 5(2):295–304. <https://doi.org/10.1039/c6bm00788k>
36. Xu Y, Mizuno T, Sridharan A, Du Y, Guo M et al (2016) Single-cell RNA sequencing identifies diverse roles of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight* 1(20):e90558. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90558>
37. Rotoli BM, Bussolati O, Sala R, Gazzola GC, Dall'Asta V (2005) The transport of cationic amino acids in human airway cells: expression of system y+L activity and transepithelial delivery of NOS inhibitors. *FASEB J* 19(7):810–812. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2924fje>
38. Muller A, Chiotellis A, Keller C, Ametamey SM, Schibli R et al (2014) Imaging tumour ATB0,+ transport activity by PET with the cationic amino acid O-2-(2-[18F]fluoroethyl)methyl-amino ethyltyrosine. *Mol Imaging Biol* 16(3):412–420. <https://doi.org/10.1007/s11307-013-0711-2>
39. Gorrieri G, Scudieri P, Caci E, Schiavon M, Tomati V et al (2016) Goblet cell hyperplasia requires high bicarbonate transport to support mucin release. *Sci Rep* 6:36016. <https://doi.org/10.1038/srep36016>
40. Chin S, Hung M, Won A, Wu YS, Ahmadi S et al (2018) Lipophilicity of the cystic fibrosis drug, Ivacaftor (VX-770), and its destabilizing effect on the major CF-causing mutation: F508del. *Mol Pharmacol* 94(2):917–925. <https://doi.org/10.1124/mol.118.112177>
41. Eriksson A, Flach CF, Lindgren A, Kvifors E, Lange S (2008) Five mucosal transcripts of interest in ulcerative colitis identified by quantitative real-time PCR: a prospective study. *BMC Gastroenterol* 8:34. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-8-34>
42. Flach CF, Qadri F, Bhuiyan TR, Alam NH, Jennische E et al (2007) Differential expression of intestinal membrane transporters in cholera patients. *FEBS Lett* 581(17):3183–3188. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.001>
43. Anderson CM, Howard A, Walters JR, Ganapathy V, Thwaites DT (2009) Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H+-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na+- and Cl(-)-dependent TauT (SLC6A6). *J Physiol* 587(Pt 4):731–744. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.164228>
44. Kou L, Yao Q, Sivaprakasam S, Luo Q, Sun Y et al (2017) Dual targeting of l-carnitine-conjugated nanoparticles to OCTN2 and ATB(0,+) to deliver chemotherapeutic agents for colon cancer therapy. *Drug Deliv* 24(1):1338–1349. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1377316>
45. Ikpa PT, Meijssen KF, Nieuwenhuijze NDA, Dulla K, de Jonge HR et al (2019) Transcriptome analysis of the distal small intestine of Cfr null mice. *Genomics*. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.06.028>
46. Eriksson A, Jennische E, Flach CF, Jorge A, Lange S (2008) Real-time PCR quantification analysis of five mucosal transcripts in patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20(4):290–296. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e3282f3557c>
47. Wang H, Ji Y, Wu G, Sun K, Sun Y et al (2015) l-Tryptophan activates mammalian target of rapamycin and enhances expression of tight junction proteins in intestinal porcine epithelial cells. *J Nutr* 145(6):1156–1162. <https://doi.org/10.3945/jn.114.209817>
48. Anderson CM, Ganapathy V, Thwaites DT (2008) Human solute carrier SLC6A14 is the beta-alanine carrier. *J Physiol* 586(17):4061–4067. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.154500>
49. Jain-Vakkalagadda B, Pal D, Gunda S, Nashed Y, Ganapathy V et al (2004) Identification of a Na+-dependent cationic and neutral amino acid transporter, B(0,+), in human and rabbit cornea. *Mol Pharm* 1(5):338–346
50. Kekuda R, Torres-Zamorano V, Fei YJ, Prasad PD, Li HW et al (1997) Molecular and functional characterization of intestinal Na(+)-dependent neutral amino acid transporter B0. *Am J Physiol* 272(6 Pt 1):G1463–1472. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.272.6.G1463>
51. Uchiyama T, Fujita T, Gukasyan HJ, Kim KJ, Borok Z et al (2008) Functional characterization and cloning of amino acid transporter B(0,+) (ATB(0,+)) in primary cultured rat pneumocytes. *J Cell Physiol* 214(3):645–654. <https://doi.org/10.1002/jcp.21254>
52. Ugawa S, Sunouchi Y, Ueda T, Takahashi E, Saishin Y et al (2001) Characterization of a mouse colonic system B(0+) amino acid transporter related to amino acid absorption in colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(2):G365–370. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.281.2.G365>
53. Sikder MOF, Yang S, Ganapathy V, Bhutia YD (2017) The Na(+)/Cl(-)-coupled, broad-specific, amino acid transporter SLC6A14

- (ATB(0,+)): emerging roles in multiple diseases and therapeutic potential for treatment and diagnosis. *AAPS J* 20(1):12. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0164-7>
54. Gupta N, Prasad PD, Ghamande S, Moore-Martin P, Herdman AV et al (2006) Up-regulation of the amino acid transporter ATB(0,+)(SLC6A14) in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 100(1):8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.08.016>
 55. Gupta N, Miyauchi S, Martindale RG, Herdman AV, Podolsky R et al (2005) Upregulation of the amino acid transporter ATB0,+ (SLC6A14) in colorectal cancer and metastasis in humans. *Biochim Biophys Acta* 1741(1–2):215–223. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.04.002>
 56. Coothankandaswamy V, Cao S, Xu Y, Prasad PD, Singh PK et al (2016) Amino acid transporter SLC6A14 is a novel and effective drug target for pancreatic cancer. *Br J Pharmacol* 173(23):3292–3306. <https://doi.org/10.1111/bph.13616>
 57. Penheiter AR, Erdogan S, Murphy SJ, Hart SN, Felipe Lima J et al (2015) Transcriptomic and immunohistochemical profiling of SLC6A14 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Biomed Res Int* 2015:593572. <https://doi.org/10.1155/2015/593572>
 58. Karunakaran S, Ramachandran S, Coothankandaswamy V, Elangovan S, Babu E et al (2011) SLC6A14 (ATB0,+) protein, a highly concentrative and broad specific amino acid transporter, is a novel and effective drug target for treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *J Biol Chem* 286(36):31830–31838. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.229518>
 59. Flach CF, Eriksson A, Jennische E, Lange S, Gunnerek C et al (2006) Detection of elafin as a candidate biomarker for ulcerative colitis by whole-genome microarray screening. *Inflamm Bowel Dis* 12(9):837–842. <https://doi.org/10.1097/01.mib.0000232469.23574.11>
 60. Van der Goten J, Vanhove W, Lemaire K, Van Lommel L, Machiels K et al (2014) Integrated miRNA and mRNA expression profiling in inflamed colon of patients with ulcerative colitis. *PLoS ONE* 9(12):e116117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116117>
 61. Low END, Mokhtar NM, Wong Z, Raja Ali RA (2019) Colonic mucosal transcriptomic changes in patients with long-duration ulcerative colitis revealed colitis-associated cancer pathways. *J Crohns Colitis* 13(6):755–763. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz002>
 62. Cecchini MJ, Hosein K, Howlett CJ, Joseph M, Mura M (2018) Comprehensive gene expression profiling identifies distinct and overlapping transcriptional profiles in non-specific interstitial pneumonia and idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 19(1):153. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0857-1>
 63. Bacci M, Lorito N, Ippolito L, Ramazzotti M, Luti S et al (2019) Reprogramming of amino acid transporters to support aspartate and glutamate dependency sustains endocrine resistance in breast cancer. *Cell Rep* 28(1):104–118. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.010> (e108)
 64. Babu E, Bhutia YD, Ramachandran S, Gnanaprakasam JP, Prasad PD et al (2015) Deletion of the amino acid transporter Slc6a14 suppresses tumour growth in spontaneous mouse models of breast cancer. *Biochem J* 469(1):17–23. <https://doi.org/10.1042/BJ20150437>
 65. Li XH, Qu JQ, Yi H, Zhang PF, Yi HM et al (2014) Integrated analysis of differential miRNA and mRNA expression profiles in human radioresistant and radiosensitive nasopharyngeal carcinoma cells. *PLoS ONE* 9(1):e87767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087767>
 66. Zhu M, Wang N, Tsao SW, Yuen MF, Feng Y et al (2011) Up-regulation of microRNAs, miR21 and miR23a in human liver cancer cells treated with *Coptidis rhizoma* aqueous extract. *Exp Ther Med* 2(1):27–32. <https://doi.org/10.3892/etm.2010.164>
 67. Bisognin A, Sales G, Coppe A, Bortoluzzi S, Romualdi C (2012) MAGIA(2): from miRNA and genes expression data integrative analysis to microRNA-transcription factor mixed regulatory circuits (2012 update). *Nucleic Acids Res* 40(Web Server issue):W13–21. <https://doi.org/10.1093/nar/gks460>
 68. Yanai H, Ben-Shachar S, Baram L, Elad H, Gitstein G et al (2015) Gene expression alterations in ulcerative colitis patients after restorative proctocolectomy extend to the small bowel proximal to the pouch. *Gut* 64(5):756–764. <https://doi.org/10.1136/gutjn1-2014-307387>
 69. D'Argenio G, Calvani M, Casamassimi A, Petillo O, Margarucci S et al (2006) Experimental colitis: decreased Octn2 and Atb0+ expression in rat colonocytes induces carnitine depletion that is reversible by carnitine-loaded liposomes. *FASEB J* 20(14):2544–2546. <https://doi.org/10.1096/fj.06-5950fje>
 70. Miranda RC, Vetter SB, Genro JP, Campagnolo PD, Mattevi VS et al (2015) SLC6A14 and 5-HTR2C polymorphisms are associated with food intake and nutritional status in children. *Clin Biochem* 48(18):1277–1282. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.07.003>
 71. Durand E, Boutin P, Meyre D, Charles MA, Clement K et al (2004) Polymorphisms in the amino acid transporter solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter) member 14 gene contribute to polygenic obesity in French Caucasians. *Diabetes* 53(9):2483–2486. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.9.2483>
 72. Suviolahti E, Oksanen LJ, Ohman M, Cantor RM, Ridderstrale M et al (2003) The SLC6A14 gene shows evidence of association with obesity. *J Clin Invest* 112(11):1762–1772. <https://doi.org/10.1172/JCI17491>
 73. Corpeleijn E, Petersen L, Holst C, Saris WH, Astrup A et al (2010) Obesity-related polymorphisms and their associations with the ability to regulate fat oxidation in obese Europeans: the NUGENOB study. *Obesity (Silver Spring)* 18(7):1369–1377. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.377>
 74. Noveski P, Mircevska M, Plaseski T, Peterlin B, Plaseska-Karanfilska D (2014) Study of three single nucleotide polymorphisms in the SLC6A14 gene in association with male infertility. *Balkan J Med Genet* 17(2):61–66. <https://doi.org/10.2478/bjmg-2014-0075>
 75. Smith AJP, Deloukas P, Munroe PB (2018) Emerging applications of genome-editing technology to examine functionality of GWAS-associated variants for complex traits. *Physiol Genomics* 50(7):510–522. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00028.2018>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

c. Gene therapy: a possible alternative to CFTR modulators?

1. Résumé

Le gène responsable de la mucoviscidose, CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), a été découvert en 1989. Depuis lors, la thérapie génique, qui consiste à remplacer un gène défectueux par un gène fonctionnel, reste l'objectif ultime pour traiter la cause de la maladie. Cependant, la prise en charge des patients et les traitements symptomatiques ont considérablement augmenté l'espérance de vie des patients CF, qui est passée de 5 ans dans les années 1960 à 40 ans aujourd'hui. Au cours de la dernière décennie, les travaux de recherche sur la structure et l'activité de la protéine CFTR ont conduit à la mise au point de nouveaux médicaments qui, en réadressant CFTR à la membrane plasmique (correcteurs) ou en augmentant son activité (potentialisateurs), permettent, seuls ou en association, d'améliorer la fonction pulmonaire et la qualité de vie des patients CF. Néanmoins, nous n'avons pas de recul suffisant pour savoir si la prise de ces médicaments dès le plus jeune âge et pendant des années améliorera la qualité de vie des patients atteints de CF sur le long terme et augmentera leur espérance de vie. Par ailleurs, ces molécules ne sont pas disponibles (variants spécifiques de CFTR) ou accessibles (politiques nationales de santé) pour tous les patients et il n'existe toujours pas de traitement curatif. Une autre alternative qui pourrait bénéficier des nouvelles technologies, comme la thérapie génique, reste donc intéressante, bien qu'elle ne soit pas encore proposée aux patients.

Face au développement de nouveaux correcteurs et potentialisateurs de CFTR, l'intérêt de continuer la recherche sur la thérapie génique dans le cadre du traitement de la mucoviscidose est discuté dans cette perspective.

Perspective publiée en tant que 1^{ère} auteure dans la revue *Frontiers in Pharmacology* en Avril 2021

2. Article



Gene Therapy: A Possible Alternative to CFTR Modulators?

J. Mercier¹, M. Ruffin¹, H. Corvol^{1,2} and L. Guillot^{1*}

¹Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche, Saint Antoine, F-75012, Paris, France, ²Pneumologie Pédiatrique, APHP, Hôpital Trousseau, Paris, France

Cystic fibrosis (CF) is a rare genetic disease that affects several organs, but lung disease is the major cause of morbidity and mortality. The gene responsible for CF, the *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) gene, has been discovered in 1989. Since then, gene therapy i.e., defective gene replacement by a functional one, remained the ultimate goal but unfortunately, it has not yet been achieved. However, patients care and symptomatic treatments considerably increased CF patients' life expectancy ranging from 5 years old in the 1960s to 40 today. In the last decade, research works on *CFTR* protein structure and activity led to the development of new drugs which, by readdressing *CFTR* to the plasma membrane (correctors) or by enhancing its transport activity (potentiators), allow, alone or in combination, an improvement of CF patients' lung function and quality of life. While expected, it is not yet known whether taking these drugs from an early age and for years will improve the quality of life of CF patients in the long term and further increase their life expectancy. Besides, these molecules are not available (specific variants of *CFTR*) or accessible (national health policies) for all patients and there is still no curative treatment. Another alternative that could benefit from new technologies, such as gene therapy, is therefore still attractive, although it is not yet offered to patients. Faced with the development of new *CFTR* correctors and potentiators, the question arises as to whether there is still a place for gene therapy and this is discussed in this perspective.

Keywords: cystic fibrosis, gene therapy, ivacaftor, lumacaftor, tezacaftor, personalized medicine

OPEN ACCESS

Edited by:

Miquéias Lopes-Pacheco,
University of Lisbon, Portugal

Reviewed by:

Giulio Cabrini,
University of Ferrara, Italy
Kamran Miah,
University of Oxford, United Kingdom

*Correspondence:

L. Guillot
loic.guillot@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Respiratory Pharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 31 December 2020

Accepted: 24 February 2021

Published: 21 April 2021

Citation:

Mercier J, Ruffin M, Corvol H and
Guillot L (2021) Gene Therapy: A
Possible Alternative to *CFTR*
Modulators?
Front. Pharmacol. 12:648203.
doi: 10.3389/fphar.2021.648203

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is a rare genetic disease caused by pathogenic variants in the *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) gene, which encodes for a chloride channel expressed ubiquitously within epithelia. As a result, ionic and hydric imbalances across epithelia are observed in several organs, affecting their function. Specifically, manifestations can occur in the pancreas, liver, kidneys, and intestine, but lung disease is the main cause of morbidity and mortality of CF patients.

Since the *CFTR* gene discovery in 1989, more than 2000 variants of the *CFTR* gene have been identified. They were classified into six classes depending on their consequences on the *CFTR* protein. CF patients' life expectancy increased considerably between the 1960s and the beginning of the 21st century mainly due to symptomatic treatment development and to patient management standardization. However, even if new promising drugs (called "CFTR modulators") directly targeting the *CFTR* protein are already available for some CF patients, there is still no curative treatment. Gene therapy, as defined by the delivery of a wild-type *CFTR* gene in cells, might be this curative treatment but is not yet available.

TABLE 1 | CFTR modulators available for the treatment of CF patients. ppFEV1: percent-predicted Forced Expiratory Volume in 1 s; m.o.: months old; y.o.: years old. *only initial Phase III studies are cited. [detailed in (Lopes-Pacheco, 2019)].

Molecules	First approval date	Eligibility age	Indication*	Absolute change in ppFEV1
Ivacaftor	2012	≥6 m.o.	G551D/other Ramsey et al. (2011) Class III variants/Other Davies et al. (2013)	10.6% 12.5%
Lumacaftor/ivacaftor	2015	≥2 y.o.	F508del/F508del Wainwright et al. (2015)	2.8%
Tezacaftor/ivacaftor	2018	≥6 y.o.	F508del/F508del Taylor-Cousar et al. (2017) F508del/residual function variant in <i>trans</i> Rowe et al. (2017)	4% 6.8%
Elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor	2019	≥12 y.o.	F508del/minimal function variant in <i>trans</i> Middleton et al. (2019) F508del/F508del Heijerman et al. (2019)	13.8% 10.4%

This perspective briefly describes the latest development of CFTR modulators and *CFTR* gene delivery strategies and discusses whether gene therapy is a still relevant alternative to be considered with respect to these promising molecules.

CFTR Modulators

In the last decade, new drugs called “CFTR modulators” addressing the direct consequences of *CFTR* variants on the CFTR protein have been identified thanks to high-throughput screening (extensively reviewed in (Lopes-Pacheco, 2019)). The two major types of CFTR modulators are correctors and potentiators. Correctors are intended to improve CFTR trafficking to the plasma membrane, while potentiators are designed to increase CFTR channel conductance. Thus, correctors and potentiators can only be effective on certain classes of *CFTR* variants i.e., those affecting CFTR protein trafficking (class II) and conductance (class III and IV). *CFTR* class I variants, that result in the absence of protein synthesis, and *CFTR* class V and VI variants, that lead to decreased CFTR protein quantity production, are excluded from modulator therapies. CFTR modulators approval represents a breakthrough in CF care because a significant improvement in patient’s lung function (evaluated by measurements of FEV1 (forced expiratory volume in 1 s)) has been observed (Table 1).

Ivacaftor, the first potentiator designed to target the G551D gating variant (the most prevalent *CFTR* class III gating variant), showed in phase 3 clinical trial that patients gain more than 10% of FEV1 (Ramsey et al., 2011). Ivacaftor was then validated for other *CFTR* class III gating variants. A few years after, modulators targeting the most common *CFTR* variant called F508del (a class II variant) emerged. The combination of the corrector lumacaftor with the potentiator ivacaftor was approved for patient homozygotes for the F508del variant but showed limited FEV1 improvement. New correctors and combinations emerged further, which have more interesting effects on FEV1, allowing to address patients carrying only one F508del variant (Table 1). The latest combination (elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor) showed indeed impressive results with a 14% increase in FEV1 (Heijerman et al., 2019; Middleton et al., 2019). Even if the level of increased lung function remains the principal measurement of treatment efficiency, these modulators have also been shown to be beneficial for other clinical parameters including increased body-mass index, improved life quality, and decreased exacerbations frequency.

Altogether, based on their age and genotype, around 80% of the patients reported in the Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry are eligible for CFTR modulators (<https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/>). According to this registry, 10% of the patients are still too young to be eligible for CFTR modulators; and the remaining 10% carry *CFTR* variants not currently known to be responsive to modulators or have unknown or incomplete genotypes. Among these patients, it has been estimated that 7% may require genetic-based therapy.

In this new promising era, some other concerns remain. For example, it should be noted that the hindsight on these treatments is limited, which makes it difficult to assess their long-term efficacy and tolerance. According to national health policies, the cost of these treatments might also be an obstacle to their access for all CF patients. Finally, as shown in a recent retrospective study, among 845 CF patients who initiated lumacaftor/ivacaftor, 22.8% fully or temporarily discontinued their treatment mostly because of respiratory adverse events (Burgel et al., 2020). This could result in limiting the total number of patients who can benefit from these treatments.

The latest generation of modulator, the triple therapy, elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor, showed impressive results leading us to question in this perspective whether gene therapy is still attractive.

GENE THERAPY: WHAT’S UP?

Gene therapy consists of introducing a functional gene into host cells to replace a defective gene. Theoretically, this could be a perfect match for the needs of a monogenic disease as CF and could lead to a universal treatment for CF patients. Especially since Johnson and colleagues stated in 1992 that 6–10% of CFTR-corrected cells are sufficient to observe a therapeutic effect *in vitro* (Johnson et al., 1992), we can speculate that correction of all CF airway cells may not be mandatory to observe the same effect *in vivo*. However, the race for CF gene therapy turned out to be more challenging than expected so far.

Lungs: Barriers to Delivery

The lung represents an organ of choice for the delivery of organ-specific treatments due to its ease of access. Therefore, aerosol administration has been widely used in previous clinical trials of pulmonary gene therapy as reviewed by Resnier et al. (Resnier et al., 2016). However, the major difficulty encountered in these

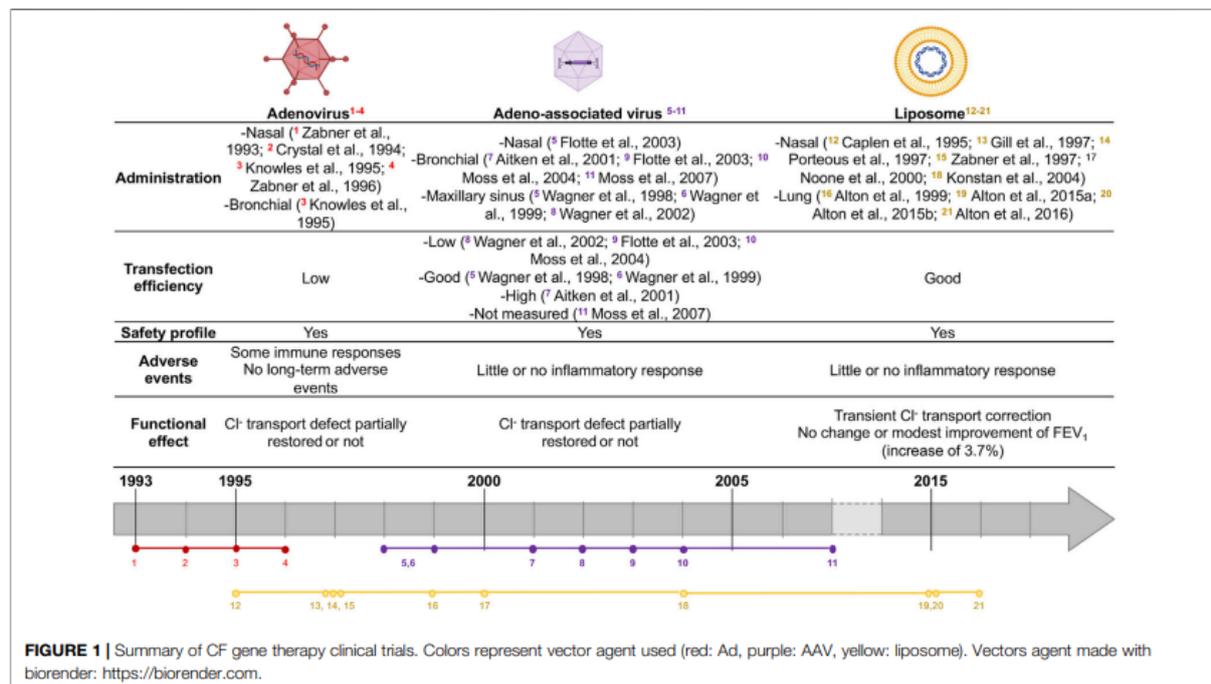


FIGURE 1 | Summary of CF gene therapy clinical trials. Colors represent vector agent used (red: Ad, purple: AAV, yellow: liposome). Vectors agent made with biorender: <https://biorender.com>.

trials is the delivery of the gene into airway epithelial cells. Indeed, mucus, mucociliary clearance, and lung immune responses complicate the entry of the gene transfer agent into target cells, and the few that succeed encounters a new obstacle: the nuclear membrane (Yonemitsu et al., 2000; Stern et al., 2003; Schuster et al., 2014; Xia et al., 2014). Moreover, since the airway epithelium renews itself gradually, another challenge is to target progenitor cells to obtain a permanent treatment and avoid repeated required deliveries (Gill and Hyde, 2014).

CFTR Gene Delivery Methods: Advantages and Limitations

Only 1 year after the *CFTR* gene discovery in 1989 (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989), two groups independently showed that it was possible to produce a functional CFTR protein by using a viral vector to introduce the full-length *CFTR* gene *in vitro* (Drumm et al., 1990; Rich et al., 1990). This proof of concept paved the way for the beginning of CF gene therapy clinical trials (Figure 1). To efficiently introduce a normal *CFTR* gene into cells, various delivery strategies have been developed for three decades, including viral and non-viral vector systems, and are briefly presented after (recently reviewed in detail by (Cooney et al., 2018; Schneider-Futschik, 2019; Yan et al., 2019)).

Viral Vectors

Viruses have a high natural capacity to infect host cells and were modified by scientists to decrease their pathogenicity. Thus, recombinant vectors expressing a foreign antigenic protein or

a functional protein were created and used for vaccines or gene therapy, respectively.

Recombinant Adenovirus Vector

Recombinant Adenovirus-based vectors (rAd-vector) were the first viral vectors used in CF gene therapy clinical trials. They are non-enveloped viruses with a linear and double-stranded DNA genome. Commonly, two serotypes are observed beyond Ad - type 2 (Ad2) or type 5 (Ad5) which allow host-cell binding. *In*

vivo studies showed that Ad-vectors were transduced in all airway epithelial cell types (Mastrangeli et al., 1993) and also in submucosal glands (Pilewski et al., 1995). The first use of Ad-vectors with *CFTR* gene in CF gene therapy clinical trial showed that their delivery was safe, with little or no immune response and a partial correction of Cl⁻ transport defect (Zabner et al., 1993; Zabner et al., 1996). Crystal et al. showed that rAd-CFTR protein was expressed in the airway epithelium 4 days after intra-bronchial administration. They tested doses up to 2×10^9 pfu, which led to short-term adverse events such as transient systemic inflammation (Crystal et al., 1994). No other adverse event was reported after a 6-months follow-up. Another trial showed no evidence of CFTR functional defect correction, probably due to inflammatory responses (Knowles et al., 1995). Thus, rAd-vectors are capable of transducing and occasionally correcting Cl⁻ transport defect in CF human airway epithelial cells. Yet, some inflammatory responses were observed. Besides, rAd-vector DNA does not integrate the host cell genome but rather persists within the cells as episomal DNA (Athanasopoulos et al., 2017). Finally, rAd-vector DNA is not replicated upon cell divisions, requiring multiple deliveries for patients.

Recombinant Adeno-Associated Virus Vector

Recombinant adeno-associated virus vectors (rAAV) are characterized by their ability to transduce both dividing and quiescent cells and by their high transduction efficiency in primary human airway (Yan et al., 2013). Those vectors are less immunogenic than Ad-vectors and were the most used vectors in CF gene therapy clinical trials, showing a strong safety profile record but failed in improving the lung function (Wagner et al., 1999; Wagner et al., 1998; Aitken et al., 2001; Wagner et al., 2002; Flotte et al., 2003; Moss et al., 2007) (Figure 1).

A limitation of rAAV vector is its packaging capacity limited to 4.8 kb (Blacklow et al., 1988; Wu et al., 2010). The small size of this vector may give it an advantage to enter cells more easily but considering that the size of the *CFTR* gene is 4.6 kb, there is almost no space left for regulatory sequences allowing *CFTR* gene expression enhancement. As reviewed by Cooney and coll., the shortening of the *CFTR* gene and other cassette sequences led to a generation of modified AAV vectors that expressed functional CFTR.

Moreover, rAAVs genome integrates into the human genome (Kotin et al., 1991; Samulski et al., 1991; Kotin et al., 1992; Rivadeneira et al., 1998; Ding et al., 2003; Janovitz et al., 2014) and can also persist as episomal DNA in post-mitotic tissues when the replication protein *rep* is absent (Athanasopoulos et al., 2017). Besides, rAAV-mediated transduction has been proved to induce a long-lasting gene expression up to several months in pigs (Steines et al., 2016) and better rAAV vectors allowing an increased packaging capacity and higher tropism for airway epithelial cells are developed (Yan et al., 2019).

Helper-Dependent Adenovirus Vector

Helper-dependent adenovirus (Hd-Ad) vectors, which have had all viral genes deleted, were developed to circumvent inflammatory properties of rAd-vectors (Parks et al., 1996). With a 36 kb packaging capacity (Cots et al., 2013), they circumvent little packaging capacities of rAAV-vectors. Multiple serotypes of Hd-Ad vectors have been tested but serotype 5 showed effective transduction *in vivo* in airways basal cells in mouse and pig models and, *in vitro*, in primary human airway epithelial cell cultures (Cao et al., 2018; Palmer et al., 2020).

Lentivirus

Finally, the last type of viral vector used for CF gene therapy studies is lentiviral vector, which could allow a genomic integration and provide a long-term expression (Naldini et al., 1996) without repeated administrations. Even if LV vectors seem less likely to be destroyed by immune system than rAAVs, because of no-preexisting immunity (neutralizing antibodies), they activate the immune system as the other viral vectors (Nayak and Herzog, 2010). LV-mediated transgene integration site into the host genome can be multiple, extremely variable and potentially leading to proto-oncogenes activation. This property led to the interruption of a clinical trial in severe combined immunodeficiency patients (Hacein-Bey-Abina et al., 2003a; Hacein-Bey-Abina et al., 2003b; Fischer et al., 2004; Fischer

and Cavazzana-Calvo, 2005; Hacein-Bey-Abina et al., 2008). In order to circumvent this, LV vectors design was then improved with self-inactivating (SIN) of long terminal repeats (LTRs), reducing the genotoxic risk of these strong enhancer-promoter sequences (Modlich and Baum, 2009; Milone and O'Doherty, 2018). Thus, lentiviruses still seem to be interesting vectors for CF gene therapy as some lentiviral vector pseudotypes demonstrated high vector production and apical tropism to airway epithelium *in vitro* and *in vivo* (Sinn et al., 2005; McKay et al., 2006). Plus, repeated administration was possible without blocking antibody immune responses (Sinn et al., 2008; Griesenbach et al., 2012) and LV efficiency was demonstrated in several animal models including mice, ferret and pigs (Oakland et al., 2013; Yan et al., 2015; Cooney et al., 2016). Recently, a study with a promising lentiviral vector developed by the United Kingdom Cystic Fibrosis Gene Therapy consortium showed a 14% airway cells transduction efficiency *in vitro*, low toxicity and an integration site profile supporting a future first-in-man trial (Alton et al., 2017).

Nevertheless, viral vectors use can be limited by several factors. Firstly, neutralizing antibodies to Ad or AAV, due to the immune response to previous natural infection, are frequently found in patients, rendering them ineligible for this kind of treatments (Erles et al., 1999). Secondly, viral vectors internalization into host cells requires receptors such as α_v integrins (Wickham et al., 1993), Coxsackie-Adenovirus Receptor (Bergelson et al., 1997), heparan sulfate glycosaminoglycans (Dehecchi et al., 2001) or fibroblast growth factor receptors (Duan et al., 1998) that are expressed on the basolateral membrane of bronchial epithelial cells, thus explaining the lack of transduction efficiency (Duan et al., 1998; Pickles et al., 1998; Marquez Loza et al., 2019). Pseudotyping viral vectors with proteins able to interact with apical membrane receptors of airway epithelial cells is thus required to enhance delivery efficiency.

Non-Viral Vectors

Non-viral vectors allow genomic material delivery into cells by direct administration as naked DNA or associated with different compounds. Those vectors have theoretically no size restrictions and have mainly three possible configurations: lipid-based, peptide-based or polymer-based delivery. They can carry plasmid or linear DNA as well as RNA molecules. A non-viral strategy for *CFTR* delivery was considered as an alternative to viral vectors. Indeed, several studies showed that cationic lipids were safe delivery vehicles for gene transfer (Kollen et al., 1996; Fasbender et al., 1998; McDonald et al., 1998), their main issue remaining the limited transgene delivery into the nucleus (Brisson et al., 1999). However, as recently reviewed (Cooney et al., 2018), several clinical trials using cationic lipids showed transient expression of vector related-*CFTR* for few days and partial restoration of nasal potential differences in CF patients without significant clinical effect on lung function (Caplen et al., 1995; Gill et al., 1997; Porteous et al., 1997; Zabner et al., 1997; Alton et al., 1999; Noone et al., 2000; Ruiz et al., 2001; Konstan et al., 2004). In 2015, Alton and colleagues reported an increase in FEV1 of 3.7% (0.07–7.25%) after using pGM169/GL67A cationic lipid (Alton et al., 2015b) in patients who received nebulized

vector at 28 days intervals for 12 months (Alton et al., 2015a). However, as FEV1 improvements observed were only comparable to those obtained with some CFTR modulators, trial did not result in the current clinical application for CF patients. Alton et al. now focused on alternative lentiviral vectors candidates, such as the lentiviral vector based on simian immunodeficiency virus (SIV) pseudotyped with Sendai virus envelope proteins Fusion (F) and Hemagglutinin-Neuraminidase (HN) (rSIV.F/HN), which retains 90–100% transduction efficiency and leads to a functional CFTR expression in preclinical models (Alton et al., 2016; Alton et al., 2017).

GENE THERAPY STILL TO CONSIDER?

To date, CF gene therapy clinical trials have not been conclusive, with a weak effect observed on CF patients' lung function, associated with important immune responses, which may render the treatment ineffective. Moreover, as mentioned previously, the recent developments of effective drugs such as the triple combination elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor, which greatly improves patients' lung function and quality of life, has given rise to the idea that "cystic fibrosis is almost cured". Thus, it is therefore legitimate to wonder to what extent gene therapy still has a place in the treatment of CF. However, it should be remembered that the drugs currently on the market still leave aside at least 10% of CF patients without curative treatment, as highlighted by the Cystic Fibrosis Foundation patient registry. In addition, current CFTR modulators are not well tolerated by all eligible patients and real-life studies show that numerous patients stop their treatment. Besides, we do not have enough hindsight to predict effectiveness of these promising drugs in the long term.

Over the last 20 years, gene therapy has shown successful transient or permanent results for several diseases such as X-linked severe combined immune deficiency (Cavazzana-Calvo et al., 2000), adenosine deaminase deficiency (Cicalese et al., 2016), Leber congenital amaurosis (Cideciyan et al., 2013), hemophilia (Nathwani et al., 2011), severe beta-Thalassemia (Cavazzana-Calvo et al., 2010; Persons, 2010), but also Parkinson's disease (Palfi et al., 2014) or leukemia, with 27 children who experienced complete remission after treatment (Maude et al., 2014). In 2012, the first viral gene-therapy treatment was approved in Europe for treatment of lipoprotein lipase deficiency (Yla-Herttuala, 2012) and showed good results

REFERENCES

- Aitken, M. L., Moss, R. B., Waltz, D. A., Dovey, M. E., Tonelli, M. R., McNamara, S. C., et al. (2001). A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease. *Hum. Gene Ther.* 12 (15), 1907–1916. doi:10.1089/104303401753153956
- Alton, E., Armstrong, D. K., Ashby, D., Bayfield, K. J., Bilton, D., Bloomfield, E. V., et al. (2016). A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of repeated nebulisation of non-viral cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene therapy in patients with cystic fibrosis (Southampton (UK):NIHR Journals Library. doi:10.3310/eme03050

even years later (Gaudet et al., 2016). Recently, gene therapy also showed promising results for Leber hereditary optic neuropathy by improving bilateral vision in patients over 96 weeks of follow-up after a unilateral intravitreal injection (Yu-Wai-Man et al., 2020). These successful trials were carried out on easily accessible hematopoietic stem cells or by direct vectors injections into specific tissues, which may explain previous trials failure in CF compared to other diseases.

In addition to wild-type CFTR gene delivery strategy, CFTR gene editing with CRISPR/Cas9 technology emerged as a promising therapeutic option for CF patients (Hodges and Conlon, 2019). New strategies are also currently tested in ongoing trials, such as RESTORE-CF phase I/II clinical trial (<http://ClinicalTrials.gov> Identifier: NCT03375047), which evaluates safety and tolerability of MRT5005, an RNA-based therapy. RNA-based therapy has the advantage of not disturbing the genome, however would require repeated doses. Another promising strategy is to combine gene therapy with pluripotent stem cells (iPSCs). As a proof of concept, Hawkins et al. succeeded to derive airway basal cells from human iPSCs, to perform an engraftment and to allow epithelial regeneration *in vivo* using a tracheal xenograft model in immune-compromised mice, with similar structure and composition than *in vivo* airways (Hawkins et al., 2020). The long-term goal is to obtain a *de novo* generation of the full diversity of lung lineages and transplantable 3D lung tissues, that could be corrected by gene therapy and transferred into CF patients (Kotton, 2012).

In conclusion, CF gene therapy still has a bright future ahead. The main current challenge is to circumvent technical problems of transduction encountered in the lung. If this happens one day, not only will CF be truly cured, but the gene therapy might also be applied to other lung genetic diseases.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JM, MR, HC, and LG wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

MR received a postdoctoral fellowship from the French cystic fibrosis non-profit organization Vaincre la mucoviscidose (RF20190502451).

- Alton, E., Stern, M., Farley, R., Jaffe, A., Chadwick, S., Phillips, J., et al. (1999). Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial. *The Lancet* 353 (9157), 947–954. doi:10.1016/s0140-6736(98)06532-5
- Alton, E. W. F. W., Armstrong, D. K., Ashby, D., Bayfield, K. J., Bilton, D., Bloomfield, E. V., et al. (2015a). Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir. Med.* 3 (9), 684–691. doi:10.1016/S2213-2600(15)00245-3
- Alton, E. W. F. W., Beekman, J. M., Boyd, A. C., Brand, J., Carlon, M. S., Connolly, M. M., et al. (2017). Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients

- with cystic fibrosis. *Thorax* 72 (2), 137–147. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-208406
- Alton, E. W. F. W., Boyd, A. C., Porteous, D. J., Davies, G., Davies, J. C., Griesenbach, U., et al. (2015b). A phase I/IIa safety and efficacy study of nebulized liposome-mediated gene therapy for cystic fibrosis supports a multidose trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 192 (11), 1389–1392. doi:10.1164/rccm.201506-1193LE
- Athanasopoulos, T., Munye, M. M., and Yáñez-Muñoz, R. J. (2017). Nonintegrating gene therapy vectors. *Hematology/Oncology Clin. North America* 31 (5), 753–770. doi:10.1016/j.hoc.2017.06.007
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., et al. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275 (5304), 1320–1323. doi:10.1126/science.275.5304.1320
- Blacklow, S. C., Raines, R. T., Lim, W. A., Zamore, P. D., and Knowles, J. R. (1988). Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. *Biochemistry* 27 (4), 1158–1165. doi:10.1021/bi00404a013
- Brisson, M., Tseng, W.-C., Almonte, C., Watkins, S., and Huang, L. (1999). Subcellular trafficking of the cytoplasmic expression system. *Hum. Gene Ther.* 10 (16), 2601–2613. doi:10.1089/1043034990016645
- Burgel, P. R., Munck, A., Durieu, I., Chiron, R., Mely, L., Prevotat, A., et al. (2020). Real-life safety and effectiveness of lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 201 (2), 188–197. doi:10.1164/rccm.201906-1227OC
- Cao, H., Ouyang, H., Grasemann, H., Bartlett, C., Du, K., Duan, R., et al. (2018). Transducing airway basal cells with a helper-dependent adenoviral vector for lung gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 29 (6), 643–652. doi:10.1089/hum.2017.201
- Caplen, N. J., Alton, E. W. F. W., Middleton, P. G., Dorin, J. R., Stevenson, B. J., Gao, X., et al. (1995). Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat. Med.* 1 (1), 39–46. doi:10.1038/nm0195-39
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nussbaum, P., et al. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288 (5466), 669–672. doi:10.1126/science.288.5466.669
- Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., et al. (2010). Transfusion independence and HMG2A activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature* 467 (7313), 318–322. doi:10.1038/nature09328
- Cicalese, M. P., Ferrua, F., Castagnaro, L., Pajino, R., Barzaghi, F., Giannelli, S., et al. (2016). Update on the safety and efficacy of retroviral gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *Blood* 128 (1), 45–54. doi:10.1182/blood-2016-01-688226
- Cideciyan, A. V., Jacobson, S. G., Beltran, W. A., Sumaroka, A., Swider, M., Iwabe, S., et al. (2013). Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (6), E517–E525. doi:10.1073/pnas.1218933110
- Cooney, A. L., Abou Alaiwa, M. H., Shah, V. S., Bouzek, D. C., Stroik, M. R., Powers, L. S., et al. (2016). Lentiviral-mediated phenotypic correction of cystic fibrosis pigs. *JCI Insight* 1 (14), e88730. doi:10.1172/jci.insight.88730
- Cooney, A., McCray, P., Jr., and Sinn, P. (2018). Cystic fibrosis gene therapy: looking back, looking forward. *Genes* 9 (11), 538. doi:10.3390/genes9110538
- Cots, D., Bosch, A., and Chillón, M. (2013). Helper dependent adenovirus vectors: progress and future prospects. *Cgt* 13 (5), 370–381. doi:10.2174/156652321305131212125338
- Crystal, R. G., McElvaney, N. G., Rosenfeld, M. A., Chu, C.-S., Mastrangeli, A., Hay, J. G., et al. (1994). Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat. Genet.* 8 (1), 42–51. doi:10.1038/ng0994-42
- Davies, J. C., Wainwright, C. E., Canny, G. J., Chilvers, M. A., Howenstine, M. S., Munck, A., et al. (2013). Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with aG551D Mutation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187 (11), 1219–1225. doi:10.1164/rccm.201301-0153OC
- Dechechi, M. C., Melotti, P., Bonizzato, A., Santacatterina, M., Chilosi, M., and Cabrini, G. (2001). Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. *J. Virol.* 75 (18), 8772–8780. doi:10.1128/jvi.75.18.8772-8780.2001
- Ding, W., Yan, Z., Zak, R., Saavedra, M., Rodman, D. M., and Engelhardt, J. F. (2003). Second-strand genome conversion of adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and AAV-5 is not rate limiting following apical infection of polarized human airway epithelia. *J. Virol.* 77 (13), 7361–7366. doi:10.1128/jvi.77.13.7361-7366.2003
- Drumm, M. L., Pope, H. A., Cliff, W. H., Rommens, J. M., Marvin, S. A., Tsui, L.-C., et al. (1990). Correction of the cystic fibrosis defect *in vitro* by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 62 (6), 1227–1233. doi:10.1016/0092-8674(90)90398-x
- Duan, D., Yue, Y., Yan, Z., McCray, P. B., Jr., and Engelhardt, J. F. (1998). Polarity influences the efficiency of recombinant adeno-associated virus infection in differentiated airway epithelia. *Hum. Gene Ther.* 9 (18), 2761–2776. doi:10.1089/hum.1998.9.18-2761
- Erles, K., Sebokova, P., and Schlehofer, J. R. (1999). Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J. Med. Virol.* 59 (3), 406–411. doi:10.1002/(sici)1096-9071(199911)59:3<406:aid-jmv22>3.0.co;2-n
- Fasbender, A., Lee, J. H., Walters, R. W., Moninger, T. O., Zabner, J., and Welsh, M. J. (1998). Incorporation of adenovirus in calcium phosphate precipitates enhances gene transfer to airway epithelia *in vitro* and *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 102 (1), 184–193. doi:10.1172/JCI2732
- Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2005). Integration of retroviruses: a fine balance between efficiency and danger. *Plos Med.* 2 (1), e10. doi:10.1371/journal.pmed.0020010
- Fischer, A., Abina, S. H., Thrasher, A., von Kalle, C., and Cavazzana-Calvo, M. (2004). LMO2 and gene therapy for severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 350 (24), 2526–2527. doi:10.1056/NEJM200406103502422
- Flotte, T. R., Zeitlin, P. L., Reynolds, T. C., Heald, A. E., Pedersen, P., Beck, S., et al. (2003). Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum. Gene Ther.* 14 (11), 1079–1088. doi:10.1089/104303403322124792
- Gaudet, D., Stroes, E. S., Méthot, J., Brisson, D., Tremblay, K., Bernelot Moens, S. J., et al. (2016). Long-term retrospective analysis of gene therapy with alipogene tiparvovec and its effect on lipoprotein lipase deficiency-induced pancreatitis. *Hum. Gene Ther.* 27 (11), 916–925. doi:10.1089/hum.2015.158
- Gill, D. R., and Hyde, S. C. (2014). Delivery of genes into the CF airway. *Thorax* 69 (10), 962–964. doi:10.1136/thoraxjnl-2014-205835
- Gill, D., Southern, K., Mofford, K., Seddon, T., Huang, L., Sorgi, F., et al. (1997). A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther.* 4 (3), 199–209. doi:10.1038/sj.gt.3300391
- Griesenbach, U., Inoue, M., Meng, C., Farley, R., Chan, M., Newman, N. K., et al. (2012). Assessment of F/HN-pseudotyped lentivirus as a clinically relevant vector for lung gene therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186 (9), 846–856. doi:10.1164/rccm.201206-1056OC
- Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., et al. (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* 118 (9), 3132–3142. doi:10.1172/JCI35700
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., et al. (2003a). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 348 (3), 255–256. doi:10.1056/NEJM200301163480314
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., et al. (2003b). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302 (5644), 415–419. doi:10.1126/science.1088547
- Hawkins, F. J., Suzuki, S., Beermann, M. L., Barilla, C., Wang, R., Villacorta-Martin, C., et al. (2021). Derivation of airway basal stem cells from human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 28, 79. doi:10.1016/j.stem.2020.09.017
- Heijerman, H. G. M., McKone, E. F., Downey, D. G., Van Braeckel, E., Rowe, S. M., Tullis, E., et al. (2019). Efficacy and safety of the elxacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *The Lancet* 394 (10212), 1940–1948. doi:10.1016/S0140-6736(19)32597-8
- Hodges, C. A., and Conlon, R. A. (2019). Delivering on the promise of gene editing for cystic fibrosis. *Genes Dis.* 6 (2), 97–108. doi:10.1016/j.gendis.2018.11.005

- Janovitz, T., Oliveira, T., Sadelain, M., Falck-Pedersen, E., and Imperiale, M. J. (2014). Highly divergent integration profile of adeno-associated virus serotype 5 revealed by high-throughput sequencing. *J. Virol.* 88 (5), 2481–2488. doi:10.1128/JVI.03419-13
- Johnson, L. G., Olsen, J. C., Sarkadi, B., Moore, K. L., Swanson, R., and Boucher, R. C. (1992). Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat. Genet.* 2 (1), 21–25. doi:10.1038/ng0992-21
- Kerem, B., Rommens, J., Buchanan, J., Markiewicz, D., Cox, T., Chakravarti, A., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245 (4922), 1073–1080. doi:10.1126/science.2570460
- Knowles, M. R., Hohnaker, K. W., Zhou, Z., Olsen, J. C., Noah, T. L., Hu, P.-C., et al. (1995). A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 333 (13), 823–831. doi:10.1056/NEJM199509283331302
- Kollen, W. J. W., Midoux, P., Erbacher, P., Yip, A., Roche, A. C., Monsigny, M., et al. (1996). Gluconoylated and glycosylated polylysines as vectors for gene transfer into cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum. Gene Ther.* 7 (13), 1577–1586. doi:10.1089/hum.1996.7.13-1577
- Konstan, M. W., Davis, P. B., Wagener, J. S., Hilliard, K. A., Stern, R. C., Milgram, L. J. H., et al. (2004). Compacted DNA nanoparticles administered to the nasal mucosa of cystic fibrosis subjects are safe and demonstrate partial to complete cystic fibrosis transmembrane regulator reconstitution. *Hum. Gene Ther.* 15 (12), 1255–1269. doi:10.1089/hum.2004.15.1255
- Kotin, R. M., Linden, R. M., and Berns, K. I. (1992). Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J.* 11 (13), 5071–5078. doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05614.x
- Kotin, R. M., Menninger, J. C., Ward, D. C., and Berns, K. I. (1991). Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics* 10 (3), 831–834. doi:10.1016/0888-7543(91)90470-y
- Kotton, D. N. (2012). Next-generation regeneration: the hope and hype of lung stem cell research. *Am. J. Res. Crit. Care Med.* 185, 1255–1260. doi:10.1164/rccm.201202-0228PP
- Lopes-Pacheco, M. (2019). CFTR modulators: the changing face of cystic fibrosis in the era of precision medicine. *Front. Pharmacol.* 10, 1662. doi:10.3389/fphar.2019.01662
- Marquez Loza, L., Yuen, E., and McCray, P., Jr. (2019). Lentiviral vectors for the treatment and prevention of cystic fibrosis lung disease. *Genes* 10 (3), 218. doi:10.3390/genes10030218
- Mastrangeli, A., Danel, C., Rosenfeld, M. A., Stratford-Perricaudet, L., Perricaudet, M., Pavirani, A., et al. (1993). Diversity of airway epithelial cell targets for *in vivo* recombinant adenovirus-mediated gene transfer. *J. Clin. Invest.* 91 (1), 225–234. doi:10.1172/JCI116175
- Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., et al. (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N. Engl. J. Med.* 371 (16), 1507–1517. doi:10.1056/NEJMoa1407222
- McDonald, R. J., Liggitt, H. D., Roche, L., Nguyen, H. T., Pearlman, R., Raabe, O. G., et al. (1998). Aerosol delivery of lipid:DNA complexes to lungs of rhesus monkeys. *Pharm. Res.* 15 (5), 671–679. doi:10.1023/a:1011902532163
- McKay, T., Patel, M., Pickles, R. J., Johnson, L. G., and Olsen, J. C. (2006). Influenza M2 envelope protein augments avian influenza hemagglutinin pseudotyping of lentiviral vectors. *Gene Ther.* 13 (8), 715–724. doi:10.1038/sj.gt.3302715
- Middleton, P. G., Mall, M. A., Dřevínek, P., Lands, L. C., McKone, E. F., Polineni, D., et al. (2019). Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N. Engl. J. Med.* 381 (19), 1809–1819. doi:10.1056/NEJMoa1908639
- Milone, M. C., and O'Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* 32 (7), 1529–1541. doi:10.1038/s41375-018-0106-0
- Modlich, U., and Baum, C. (2009). Preventing and exploiting the oncogenic potential of integrating gene vectors. *J. Clin. Invest.* 119 (4), 755–758. doi:10.1172/jci38831
- Moss, R. B., Milla, C., Colombo, J., Accurso, F., Zeitlin, P. L., Clancy, J. P., et al. (2007). Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Hum. Gene Ther.* 18 (8), 726–732. doi:10.1089/hum.2007.022
- Moss, R. B., Rodman, D., Spencer, L. T., Aitken, M. L., Zeitlin, P. L., Waltz, D., et al. (2004). Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis. *Chest* 125 (2), 509–521. doi:10.1378/chest.125.2.509
- Naldini, L., Blomer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., et al. (1996). *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272 (5259), 263–267. doi:10.1126/science.272.5259.263
- Nathwani, A. C., Tuddenham, E. G. D., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D. C., et al. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 365 (25), 2357–2365. doi:10.1056/NEJMoa1108046
- Nayak, S., and Herzog, R. W. (2010). Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther.* 17 (3), 295–304. doi:10.1038/gt.2009.148
- Noone, P. G., Hohnaker, K. W., Zhou, Z., Johnson, L. G., Foy, C., Gipson, C., et al. (2000). Safety and biological efficacy of a lipid-CFTR complex for gene transfer in the nasal epithelium of adult patients with cystic fibrosis. *Mol. Ther.* 1 (1), 105–114. doi:10.1006/mthe.1999.0009
- Oakland, M., Maury, W., McCray, P. B., Jr., and Sinn, P. L. (2013). Intrapulmonary versus nasal transduction of murine airways with GP64-pseudotyped viral vectors. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2, e69. doi:10.1038/mtna.2012.60
- Palfi, S., Gurruchaga, J. M., Ralph, G. S., Lepetit, H., Lavis, S., Buttery, P. C., et al. (2014). Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *The Lancet* 383 (9923), 1138–1146. doi:10.1016/S0140-6736(13)61939-X
- Palmer, D. J., Turner, D. L., and Ng, P. (2020). A single "All-in-One" helper-dependent adenovirus to deliver donor DNA and CRISPR/Cas9 for efficient homology-directed repair. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 17, 441–447. doi:10.1016/j.omtm.2020.01.014
- Parks, R. J., Chen, L., Anton, M., Sankar, U., Rudnicki, M. A., and Graham, F. L. (1996). A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (24), 13565–13570. doi:10.1073/pnas.93.24.13565
- Persons, D. A. (2010). Targeting β -thalassaemia. *Nature* 467 (7313), 277–278. doi:10.1038/467277a
- Pickles, R. J., McCarty, D., Matsui, H., Hart, P. J., Randall, S. H., and Boucher, R. C. (1998). Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer. *J. Virol.* 72 (7), 6014–6023. doi:10.1128/JVI.72.7.6014-6023.1998
- Pilewski, J. M., Engelhardt, J. F., Bavaria, J. E., Kaiser, L. R., Wilson, J. M., and Albelda, S. M. (1995). Adenovirus-mediated gene transfer to human bronchial submucosal glands using xenografts. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 268 (4 Pt 1), L657–L665. doi:10.1152/ajplung.1995.268.4.L657
- Porteous, D., Dorin, J., McLachlan, G., Davidson-Smith, H., Davidson, H., Stevenson, B., et al. (1997). Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther.* 4 (3), 210–218. doi:10.1038/sj.gt.3300390
- Ramsey, B. W., Davies, J., McElvaney, N. G., Tullis, E., Bell, S. C., Dřevínek, P., et al. (2011). A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N. Engl. J. Med.* 365 (18), 1663–1672. doi:10.1056/NEJMoa1105185
- Resnier, P., Mottais, A., Sibiril, Y., Le Gall, T., and Montier, T. (2016). Challenges and successes using nanomedicines for aerosol delivery to the airways. *Cgt* 16 (1), 34–46. doi:10.2174/1566523216666160104142013
- Rich, D. P., Anderson, M. P., Gregory, R. J., Cheng, S. H., Paul, S., Jefferson, D. M., et al. (1990). Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 347 (6291), 358–363. doi:10.1038/347358a0
- Riordan, J. R., Rommens, J., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245 (4922), 1066–1073. doi:10.1126/science.2475911
- Rivadeneira, E. D., Popescu, N. C., Zimonjic, D. B., Cheng, G. S., Nelson, P. J., Ross, M. D., et al. (1998). Sites of recombinant adeno-associated virus integration. *Int. J. Oncol.* 12 (4), 805–810. doi:10.3892/ijo.12.4.805
- Rommens, J., Iannuzzi, M., Kerem, B., Drumm, M., Melmer, G., Dean, M., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245 (4922), 1059–1065. doi:10.1126/science.2772657

- Rowe, S. M., Daines, C., Ringshausen, F. C., Kerem, E., Wilson, J., Tullis, E., et al. (2017). Tezacaftor-ivacaftor in residual-function heterozygotes with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 377 (21), 2024–2035. doi:10.1056/NEJMoa1709847
- Ruiz, F. E., Clancy, J. P., Perricone, M. A., Bebok, Z., Hong, J. S., Cheng, S. H., et al. (2001). A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis. *Hum. Gene Ther.* 12 (7), 751–761. doi:10.1089/104303401750148667
- Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J. D., Housman, D. E., Epstein, N., et al. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* 10 (12), 3941–3950. doi:10.1002/j.1460-2075.1991.tb04964.x
- Schneider-Futschik, E. K. (2019). Beyond cystic fibrosis transmembrane conductance regulator therapy: a perspective on gene therapy and small molecule treatment for cystic fibrosis. *Gene Ther.* 26 (9), 354–362. doi:10.1038/s41434-019-0092-5
- Schuster, B. S., Kim, A. J., Kays, J. C., Kanzawa, M. M., Guggino, W. B., Boyle, M. P., et al. (2014). Overcoming the cystic fibrosis sputum barrier to leading adeno-associated virus gene therapy vectors. *Mol. Ther.* 22 (8), 1484–1493. doi:10.1038/mt.2014.89
- Sinn, P. L., Arias, A. C., Brogden, K. A., and McCray, P. B., Jr. (2008). Lentivirus vector can be readministered to nasal epithelia without blocking immune responses. *Jvi* 82 (21), 10684–10692. doi:10.1128/JVI.00227-08
- Sinn, P. L., Penisten, A. K., Burnight, E. R., Hickey, M. A., Williams, G., McCoy, D. M., et al. (2005). Gene transfer to respiratory epithelia with lentivirus pseudotyped with Jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* 16 (4), 479–488. doi:10.1089/hum.2005.16.479
- Steines, B., Dickey, D. D., Bergen, J., Excoffon, K. J. D. A., Weinstein, J. R., Li, X., et al. (2016). CFTR gene transfer with AAV improves early cystic fibrosis pig phenotypes. *JCI Insight* 1 (14), e88728. doi:10.1172/jci.insight.88728
- Stern, M., Ulrich, K., Geddes, D. M., and Alton, E. W. F. W. (2003). Poly (D, L-lactide-co-glycolide)/DNA microspheres to facilitate prolonged transgene expression in airway epithelium *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. *Gene Ther.* 10 (16), 1282–1288. doi:10.1038/sj.gt.3301994
- Taylor-Cousar, J. L., Munck, A., McKone, E. F., van der Ent, C. K., Moeller, A., Simard, C., et al. (2017). Tezacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del. *N. Engl. J. Med.* 377 (21), 2013–2023. doi:10.1056/NEJMoa1709846
- Wagner, J. A., Messner, A. H., Moran, M. L., Daifuku, R., Kouyama, K., Desch, J. K., et al. (1999). Safety and biological efficacy of an adeno-associated virus vector-cystic fibrosis transmembrane regulator (AAV-CFTR) in the cystic fibrosis maxillary sinus. *Laryngoscope* 109 (2 Pt 1), 266–274. doi:10.1097/00005537-199902000-00017
- Wagner, J. A., Moran, M. L., Messner, A. H., Daifuku, R., Conrad, C. K., Reynolds, T., et al. (1998). A phase I/II study of tgAAV-CF for the treatment of chronic sinusitis in patients with cystic fibrosis. Stanford University, Stanford, California. *Hum. Gene Ther.* 9 (6), 889–909. doi:10.1089/hum.1998.9.6-889
- Wagner, J. A., Nepomuceno, I. B., Messner, A. H., Moran, M. L., Batson, E. P., Dimiceli, S., et al. (2002). A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Hum. Gene Ther.* 13 (11), 1349–1359. doi:10.1089/104303402760128577
- Wainwright, C. E., Elborn, J. S., Ramsey, B. W., Marigowda, G., Huang, X., Cipolli, M., et al. (2015). Lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. *N. Engl. J. Med.* 373 (3), 220–231. doi:10.1056/NEJMoa1409547
- Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresch, D. A., and Nemerow, G. R. (1993). Integrins $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73 (2), 309–319. doi:10.1016/0092-8674(93)90231-e
- Wu, Z., Yang, H., and Colosi, P. (2010). Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol. Ther.* 18 (1), 80–86. doi:10.1038/mt.2009.255
- Xia, E., Munegowda, M. A., Cao, H., and Hu, J. (2014). Lung gene therapy-How to capture illumination from the light already present in the tunnel. *Genes Dis.* 1 (1), 40–52. doi:10.1016/j.gendis.2014.06.001
- Yan, Z., Lei-Butters, D. C. M., Keiser, N. W., and Engelhardt, J. F. (2013). Distinct transduction difference between adeno-associated virus type 1 and type 6 vectors in human polarized airway epithelia. *Gene Ther.* 20 (3), 328–337. doi:10.1038/gt.2012.46
- Yan, Z., McCray Jr, P. B., Jr., and Engelhardt, J. F. (2019). Advances in gene therapy for cystic fibrosis lung disease. *Hum. Mol. Genet.* 28 (R1), R88–R94. doi:10.1093/hmg/ddz139
- Yan, Z., Stewart, Z. A., Sinn, P. L., Olsen, J. C., Hu, J., McCray, P. B., Jr., et al. (2015). Ferret and pig models of cystic fibrosis: prospects and promise for gene therapy. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 26 (1), 38–49. doi:10.1089/humc.2014.154
- Ylä-Herttuala, S. (2012). Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European Union. *Mol. Ther.* 20 (10), 1831–1832. doi:10.1038/mt.2012.194
- Yonemitsu, Y., Kitson, C., Ferrari, S., Farley, R., Griesenbach, U., Judd, D., et al. (2000). Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat. Biotechnol.* 18 (9), 970–973. doi:10.1038/79463
- Yu-Wai-Man, P., Newman, N. J., Carelli, V., Moster, M. L., Biousse, V., Sadun, A. A., et al. (2020). Bilateral visual improvement with unilateral gene therapy injection for Leber hereditary optic neuropathy. *Sci. Transl. Med.* 12 (573), eaaz7423. doi:10.1126/scitranslmed.aaz7423
- Zabner, J., Cheng, S. H., Meecker, D., Launspach, J., Balfour, R., Perricone, M. A., et al. (1997). Comparison of DNA-lipid complexes and DNA alone for gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 100 (6), 1529–1537. doi:10.1172/JCI119676
- Zabner, J., Couture, L. A., Gregory, R. J., Graham, S. M., Smith, A. E., and Welsh, M. J. (1993). Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 75 (2), 207–216. doi:10.1016/0092-8674(93)80063-k
- Zabner, J., Ramsey, B. W., Meecker, D. P., Aitken, M. L., Balfour, R. P., Gibson, R. L., et al. (1996). Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 97 (6), 1504–1511. doi:10.1172/JCI118573

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

Copyright © 2021 Mercier, Ruffin, Corvol and Guillot. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

d. *Flagellin from Pseudomonas aeruginosa modulates SARS-CoV-2 infectivity in CF airway epithelial cells by increasing TMPRSS2 expression*

1. *Résumé*

Dans le cadre de la crise sanitaire de la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19), l'un des principaux défis consiste à identifier les facteurs de susceptibilité du syndrome respiratoire aigu sévère-coronavirus-2 (SARS-CoV-2). Cela permettrait d'adapter les recommandations pour les populations et de réduire le risque de développement de la COVID-19 chez les personnes les plus vulnérables, dont les patients atteints de maladies respiratoires chroniques telles que la mucoviscidose. Les cellules épithéliales des voies respiratoires (AEC) jouent un rôle essentiel dans la modulation des réponses immunitaires et de la gravité de la COVID-19. Le SARS-CoV-2 infecte les voies respiratoires par le biais du récepteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 et une protéase de l'hôte, la sérine-protéase transmembranaire 2 (TMPRSS2), joue un rôle majeur dans l'infectivité du SARS-CoV-2. Nous montrons ici que *Pseudomonas aeruginosa* augmente l'expression de TMPRSS2, notamment dans les AEC primaires présentant une déficience en CFTR. De plus, nous montrons que la flagelline de *P. aeruginosa* augmente l'expression de TMPRSS2 dans les AECs primaires et les cellules Calu-3, par l'activation du récepteur TLR-5 et de p38 MAPK. Cette augmentation est particulièrement visible dans les cellules Calu-3 déficientes pour CFTR et est associée à une augmentation intracellulaire de l'infection par le SARS-CoV-2, sans toutefois avoir d'effet sur la quantité de particules virales libérées. Compte tenu de l'urgence de la crise sanitaire liée au COVID-19, ce résultat pourrait avoir une signification clinique pour les patients CF, qui sont fréquemment infectés et colonisés par *P. aeruginosa* au cours de l'évolution de leur pathologie et pourraient développer la COVID-19.

2. Article



Flagellin From *Pseudomonas aeruginosa* Modulates SARS-CoV-2 Infectivity in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells by Increasing TMPRSS2 Expression

OPEN ACCESS

Edited by:

Rabindra Tirouvanziam,
Emory University, United States

Reviewed by:

James Harker,
Imperial College London,
United Kingdom
Luke Wisely Garratt,
University of Western Australia,
Australia

***Correspondence:**

Loïc Guillot
loic.guillot@inserm.fr

†These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Mucosal Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 24 May 2021

Accepted: 05 November 2021

Published: xx xx 2021

Citation:

Ruffin M, Bigot J, Calmel C, Mercier J,
Givelet M, Oliva J, Pizzorno A,
Rosa-Calatrava M, Corvol H, Balloy V,
Terrier O and Guillot L (2021) Flagellin
From *Pseudomonas aeruginosa*
Modulates SARS-CoV-2 Infectivity in
Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells
by Increasing TMPRSS2 Expression.
Front. Immunol. 12:714027.
doi: 10.3389/fimmu.2021.714027

Manon Ruffin^{1†}, Jeanne Bigot^{1,2†}, Claire Calmel¹, Julia Mercier¹, Maëlle Givelet¹,
Justine Oliva³, Andrés Pizzorno³, Manuel Rosa-Calatrava³, Harriet Corvol^{1,4},
Viviane Balloy¹, Olivier Terrier³ and Loïc Guillot^{1*}

¹ Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris, France, ² Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, APHP, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France, ³ CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Team VirPath, Université de Lyon, Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, Lyon, France, ⁴ Pneumologie Pédiatrique, APHP, Hôpital Trousseau, Paris, France

In the coronavirus disease 2019 (COVID-19) health crisis, one major challenge is to identify the susceptibility factors of severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2) in order to adapt the recommendations for populations, as well as to reduce the risk of COVID-19 development in the most vulnerable people, especially patients with chronic respiratory diseases such as cystic fibrosis (CF). Airway epithelial cells (AECs) play a critical role in the modulation of both immune responses and COVID-19 severity. SARS-CoV-2 infects the airway through the receptor angiotensin-converting enzyme 2, and a host protease, transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2), plays a major role in SARS-CoV-2 infectivity. Here, we show that *Pseudomonas aeruginosa* increases TMPRSS2 expression, notably in primary AECs with deficiency of the ion channel CF transmembrane conductance regulator (CFTR). Further, we show that the main component of *P. aeruginosa* flagella, the protein flagellin, increases TMPRSS2 expression in primary AECs and Calu-3 cells, through activation of Toll-like receptor-5 and p38 MAPK. This increase is particularly seen in Calu-3 cells deficient for CFTR and is associated with an intracellular increased level of SARS-CoV-2 infection, however, with no effect on the amount of virus particles released. Considering the urgency of the COVID-19 health crisis, this result may be of clinical significance for CF patients, who are frequently infected with and colonized by *P. aeruginosa* during the course of CF and might develop COVID-19.

Keywords: cystic fibrosis, infection, COVID19, *Pseudomonas aeruginosa*, SARS-CoV-2, TLR5, protease

INTRODUCTION

As of October 30, 2021, the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, caused by severe acute respiratory syndrome (SARS)-coronavirus (CoV)-2, has infected nearly 245 million people globally and led to >4.9 million deaths (<https://covid19.who.int>). In this health crisis, one of the major challenges is to identify the susceptibility factors of the infecting virus in order to adapt public health recommendations and to reduce the risk of getting COVID-19, particularly in the case of the most vulnerable people: patients with common chronic respiratory diseases such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease, and patients with less common or rare chronic respiratory diseases such as cystic fibrosis (CF). Given their lung impairments, patients with chronic respiratory diseases can reasonably be expected to face an elevated risk of developing severe COVID-19, but the magnitude of this risk remains uncertain (1). Together with clinical follow-up studies conducted to more accurately estimate the disease risk of these patients, basic research on the pathophysiology of SARS-CoV-2 infection should provide critical insights into how COVID-19 affects patients with respiratory diseases.

The aforementioned COVID-19 development in patients is particularly relevant in the case of people with CF (pwCF). CF is caused by variants in the gene *CFTR* (CF transmembrane conductance regulator), with the most frequent variant being F508del, which leads to aberrant function of airway epithelial cells (AECs). During the course of CF, the lungs of the patients are inflamed and chronically infected by various pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa*, the most prevalent pathogen (2). The most recent multinational report identified 181 cases of pwCF infected by SARS-CoV-2, and recorded 7 deaths (3); among the 181 pwCF, 82% were symptomatic, 47% were hospitalized, and 51% showed airway infection by *P. aeruginosa*.

AECs play a critical role in the regulation of both the immune response and the severity of COVID-19 (4). Notably, several studies examining SARS-CoV-2 cellular tropism have

demonstrated that ciliated and secretory cells are the major targets of infection (4–8). SARS-CoV-2 infects the airway mainly through the cell-surface receptor angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2), and two specific host proteases, TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2) and FURIN, have been shown to play a major role in SARS-CoV-2 infectivity (9–13).

Here, we show that the main component of *P. aeruginosa* flagella, the protein flagellin (*Pa-F*), upregulates TMPRSS2 expression in AECs, especially in patients' cells deficient for *CFTR*, through Toll-like receptor-5 (TLR5) and p38 activation. Importantly, this enhanced TMPRSS2 expression is associated with an increase in the level of SARS-CoV-2 infection.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Ultrapure flagellin from *P. aeruginosa* (trl-pafla) and ultrapure (trl-epstfla), recombinant (trl-flic), and vaccigrade (vac-fla) flagellin from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium were from *InvivoGen* (San Diego, CA, USA). Anti-TLR5 antibody and NF- κ B inhibitor (BAY 11-7082) were from *InvivoGen*. DMSO and p38 inhibitor (SB203580) were from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA).

Cell Culture

Calu-3 cells (ATCC HTB-55TM/Lot: 62657853) and Calu-3-*CFTR*-WT and Calu-3-*CFTR*-KD cells (generously provided by Prof. Marc Chanson, University of Geneva, Switzerland) were cultured in MEM-Glutamax (Gibco, Paisley, UK) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Eurobio, Les Ulis, France) and 1% non-essential amino acids, 10 mmol/L HEPES (pH 7.2–7.5), 1% sodium pyruvate, and 1% antibiotics (all from Gibco). They grow at the air-liquid interface, in Transwell[®] dishes (12 mm; 3460, Corning, Kennebunk, ME, USA), to obtain polarized cells as previously described (14). Primary human bronchial epithelial cells (source characteristics listed in **Table 1**) were cultured as recommended by the manufacturer by using hAEC complete culture medium (Epithelix, Geneva, Switzerland). Beas-2B cells (CRL-9609TM/Lot: 59227035) were cultured in F12 medium supplemented with 10% FCS, 10 mmol/L HEPES, and 1% antibiotics. 16HBE14o- cells were generously supplied by Pr. Dieter Gruenert (originator) and Dr. Beate Illek (provider) from the University of California San Francisco (UCSF); the cells were cultured in MEM-Glutamax supplemented with 10% FCS and 1% antibiotics, as recommended by the provider. Caco-2/TC7 cell line, a clonal population established from human colon carcinoma Caco-2 cells at late passage (15), were generously provided by Dr. Véronique Carrière (Sorbonne Université/Centre de recherche St-Antoine); the cells were cultured in high-glucose DMEM-Glutamax (Gibco) supplemented with 20% FCS, 1% non-essential amino acids, and 1% antibiotics.

Reverse Transcription-qPCR

Human RNA was isolated using a NucleoSpin RNA/miRNA kit (Macherey Nagel, Duren, Germany). RT was performed using a high-capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time qPCR was performed by using an ABI Q53 with a Sensifast Probe Lo-Rox Kit (Bio-technofix, Guibeville, France), TaqMan probes for *ACE2* (Hs01085333_m1), *TMPRSS2* (Hs00237175_m1), *FURIN* (Hs00965485_g1), and *GAPDH* (Hs02786624_g1), and a cDNA template. For relative quantification, the expression level of target genes was normalized to the expression of *GAPDH* relative to the reference group (specified in the figure legends) used as a calibrator and was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

SARS-CoV-2 Infection and Viral Quantification

Fully polarized Calu-3 cells grown at the air-liquid interface were infected with SARS-CoV-2 (strain BetaCoV/France/IDF0571/

TABLE 1 | Characteristics of donors of bronchial epithelial cells.

Group	Reference	Origin	Sex	Age	CFTR variant	Smoker	Used in
WT	02AB077201F2	Caucasian	Male	63	–	No	Figure 1C
	02AB068001F2	Caucasian	Female	71	–	No	Figure 1C
	02AB067101	Caucasian	Male	72	–	No	Figure 1C
	02AB0839.01	Caucasian	Male	54	–	No	Figure 1C
CF	CFAB043703	Unknown	Male	27	F508del/F508del	No	Figure 1C
	CFAB060901	Unknown	Female	21	F508del/F508del	No	Figure 1C
	CFAB045202	Unknown	Male	32	F508del/F508del	No	Figure 1C
	CFAB064901	Unknown	Female	37	F508del/1717-1G>A	No	Figures 1C, 3D, E

2020; accession ID EPI_ISL_411218) at a multiplicity of infection of 1, as previously described (1 h of contact with the virus followed by a change of the medium, and analysis at 24h) (16). Viral quantification through RT-qPCR targeting of ORF1b-nsp14 was performed as described (16).

Western Blotting

Total proteins were extracted using RIPA buffer (Euromedex, Souffelweyersheim, France), and then equal amounts of proteins were reduced, size-separated on 12% stain-free precast SDS-polyacrylamide gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and transferred to nitrocellulose membranes by using an iBlot2 apparatus (Thermo Fisher Scientific). The membranes were blocked in 5% milk in TBS-Tween 0.1% and incubated with specific primary antibodies overnight at 4°C; the antibodies were against ACE2 (AF933, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; 1:200), phospho- and total p38 (9211 and 9212, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; 1:2,000), phospho- and total NF- κ B p65 (3039 and 8242, Cell Signaling Technology; 1:2,000), and β -actin (A2228, Sigma-Aldrich; 1:5,000). The blots were exposed to horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (Cell Signaling Technology, 7074; 1:10,000) and anti-goat (A27104, Thermo Fisher Scientific; 1:2,000) secondary antibodies, and bound antibodies were detected using Clarity chemiluminescent substrate (Bio-Rad). Images were recorded using a Fujifilm LAS-3000 bioimaging system (Stamford, CT, USA).

Immunofluorescence

After various treatments, Calu-3 grown at the air-liquid interface were rinsed with PBS and fixed with ice-cold 4% paraformaldehyde for 20 min, permeabilized for 10 min with 0.1% Triton X-100 in PBS, and then washed with PBS and incubated in a blocking solution (PBS + 5% BSA) for 1 h. Next, the cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against TMPRSS2 (14437-1-AP, Thermo Fisher Scientific; 1:100) or ACE2 (AF933, R&D Systems; 1:60) in PBS supplemented with 1% BSA, and on the following day, the cells were washed (3 \times 5 min) with PBS and incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies, anti-rabbit Alexa 488 (4412, Cell Signaling Technology, 1:2,000) or anti-goat Alexa 488 (A11078, Thermo Fisher Scientific, 1:2,000). After staining with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), coverslips were mounted and sealed with ProLong diamond mounting medium (Thermo Fisher Scientific). Fluorescent images were obtained using an Olympus BX43 microscope (Hamburg, Germany).

ELISA

Concentrations of human IL-8, IL-6, IFN- β , IFN- λ in cell supernatants were measured using ELISA kits (DY208, DY206, DY814 and DY1598B, R&D Systems), according to the manufacturer's instructions. The substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine was from Cell Signaling Technology.

Statistical Analysis

Differences among groups were assessed for statistical significance by using Prism 9.00 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), as indicated in the figure legends. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Ethics

This project was approved (Opinion number 20-688) by the Inserm Institutional Review Board (IRB00003888, IORG0003254, FWA00005831).

Data Availability

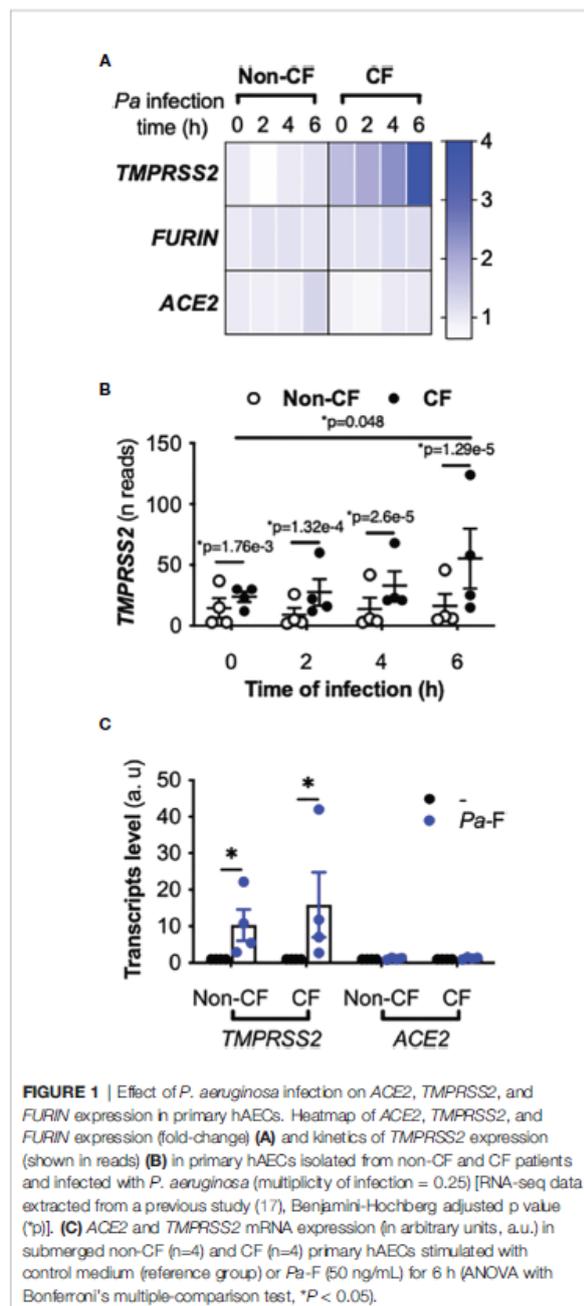
RNAseq data used here are from a transcriptomic study (17) which RNAseq raw datafiles are available in the European Nucleotide Archive (ENA) (primary accession number PRJEB9292). <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB9292>.

RESULTS

ACE2, FURIN, and TMPRSS2 Expression In CF and Non-CF Primary Human AECs Upon *P. aeruginosa* Infection

We first examined ACE2, FURIN, and TMPRSS2 expression from a previous transcriptomic study performed using primary hAECs; the cells were isolated from control (non-CF) donors and pwCF homozygous for the CFTR F508del variant, and were infected by *P. aeruginosa* (17). At baseline (time 0 h), similar ACE2 and FURIN mRNA expression levels were observed in non-CF and CF primary hAECs (Figure 1A), whereas TMPRSS2 expression was significantly higher in CF primary hAECs (Figures 1A, B). Importantly, *P. aeruginosa* infection increased TMPRSS2 mRNA expression over time in CF but not in non-CF primary hAECs (Figures 1A, B), whereas the infection did not affect ACE2 and FURIN expression (Figure 1A).

Because the most critical proinflammatory factor from *P. aeruginosa* present in the sputum of pwCF is flagellin (18), we next exposed CF primary hAECs to flagellin; treatment with



flagellin increased the mRNA level of *TMPRSS2* without increasing that of *ACE2* (Figure 1C) or *FURIN* (not illustrated). This effect was observed in both non-CF and CF primary hAECs, although in both groups, the level of induction varied considerably between individuals.

ACE2, *FURIN*, and *TMPRSS2* Expression in CFTR-Sufficient and -Deficient Calu-3 Cells Exposed to *P. aeruginosa* Flagellin

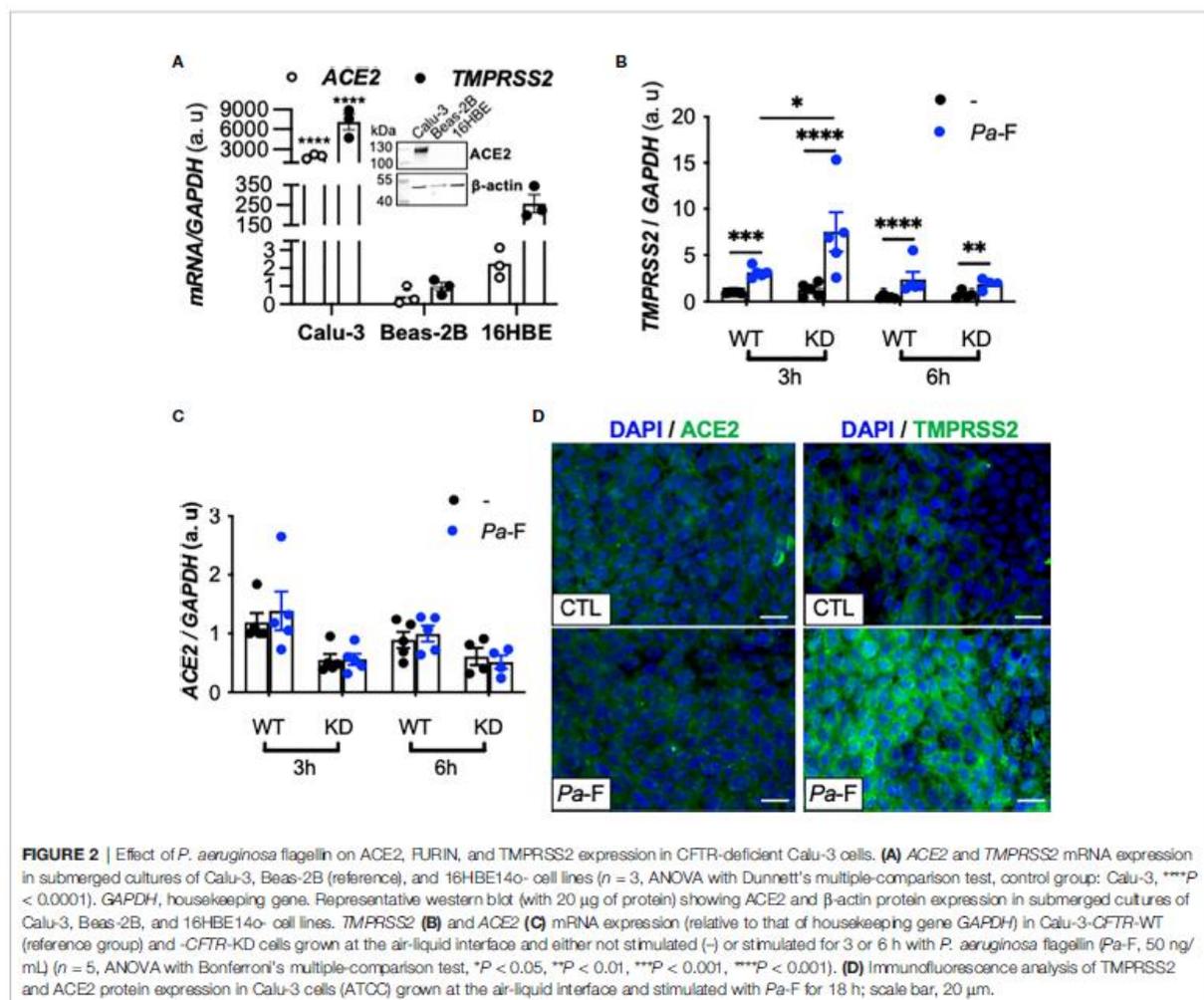
To investigate the mechanism underlying the aforementioned increase in *TMPRSS2* expression and to eliminate the interindividual variability, we sought to identify AEC lines expressing detectable levels of *ACE2* and *TMPRSS2* mRNA and protein. Thus, we measured *ACE2* and *TMPRSS2* expression in the AEC lines Calu-3, Beas-2B, and 16HBE (Figure 2A), which revealed that Calu-3 cells expressed higher mRNA levels of *ACE2* and *TMPRSS2* relative to the other cell lines, and that *ACE2* protein was detected only in Calu-3 cells. These results agree with the documented higher ability of SARS-CoV-2 to replicate in Calu-3 cells than in Beas-2B cells (10). Thus, we hereafter used the Calu-3 cell line, specifically isogenic CFTR-sufficient (Calu-3-CFTR-WT) and CFTR-deficient Calu-3 (Calu-3-CFTR-KD) cells.

In accord with what was observed in CF primary hAECs, we found that exposure of Calu-3 cells to *P. aeruginosa* flagellin significantly increased *TMPRSS2* mRNA expression (Figure 2B) in a dose-dependent manner (Supplementary Figure 1) without affecting the transcript levels of *ACE2* (Figure 2C) and *FURIN* (not illustrated). This increase in *TMPRSS2* expression was more notable in Calu-3-CFTR-KD than in Calu-3-CFTR-WT (Figure 2B), and the *TMPRSS2* upregulation was also detected at the protein level (Figure 2D). As expected, flagellin induced the synthesis of the proinflammatory cytokines interleukin (IL)-8 and IL-6 (Supplementary Figure 2A, B) both in Calu-3-CFTR-WT and Calu-3-CFTR-KD cells, and this inflammatory response was relatively higher in the Calu-3-CFTR-KD cells, which agrees with previous work showing that CF epithelial cells from human (19) or porcine (20) origin exhibit an enhanced inflammatory response to flagellin.

To ascertain whether the observed effect of flagellin is specific to the bacterial source of the protein, we used ultrapure flagellin isolated from *S. Typhimurium* serovar Typhimurium (St-F) in our assays, which revealed that St-F induced similar *TMPRSS2* expression in Calu-3 cells as did flagellin isolated from *P. aeruginosa* (Figure 3A). By contrast, recombinant flagellins (standard or vaccigradeTM) from *S. Typhimurium* did not affect the expression (Figure 3A).

Flagellin is known to activate TLR5 and the downstream p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway (21); thus, we tested the involvement of this pathway in the observed *TMPRSS2* induction. We showed that the upregulation of *TMPRSS2* expression depended on TLR5 signaling (Figure 3B). When a p38 inhibitor was used, flagellin-induced *TMPRSS2* expression was diminished in Calu-3-CFTR-KD cells

(Figure 3C) and primary CF hAECs (Figure 3D). Furthermore, an inhibitor of nuclear factor-kappa B (NF-κB) also reduced the *TMPRSS2* induction by flagellin. Accordingly, the results of western blotting confirmed that flagellin stimulated p38 phosphorylation as well as NF-κB activation (Figure 3E). Moreover, as shown previously (21), we further observed that this NF-κB activation depended on p38 activity (Figure 3E).



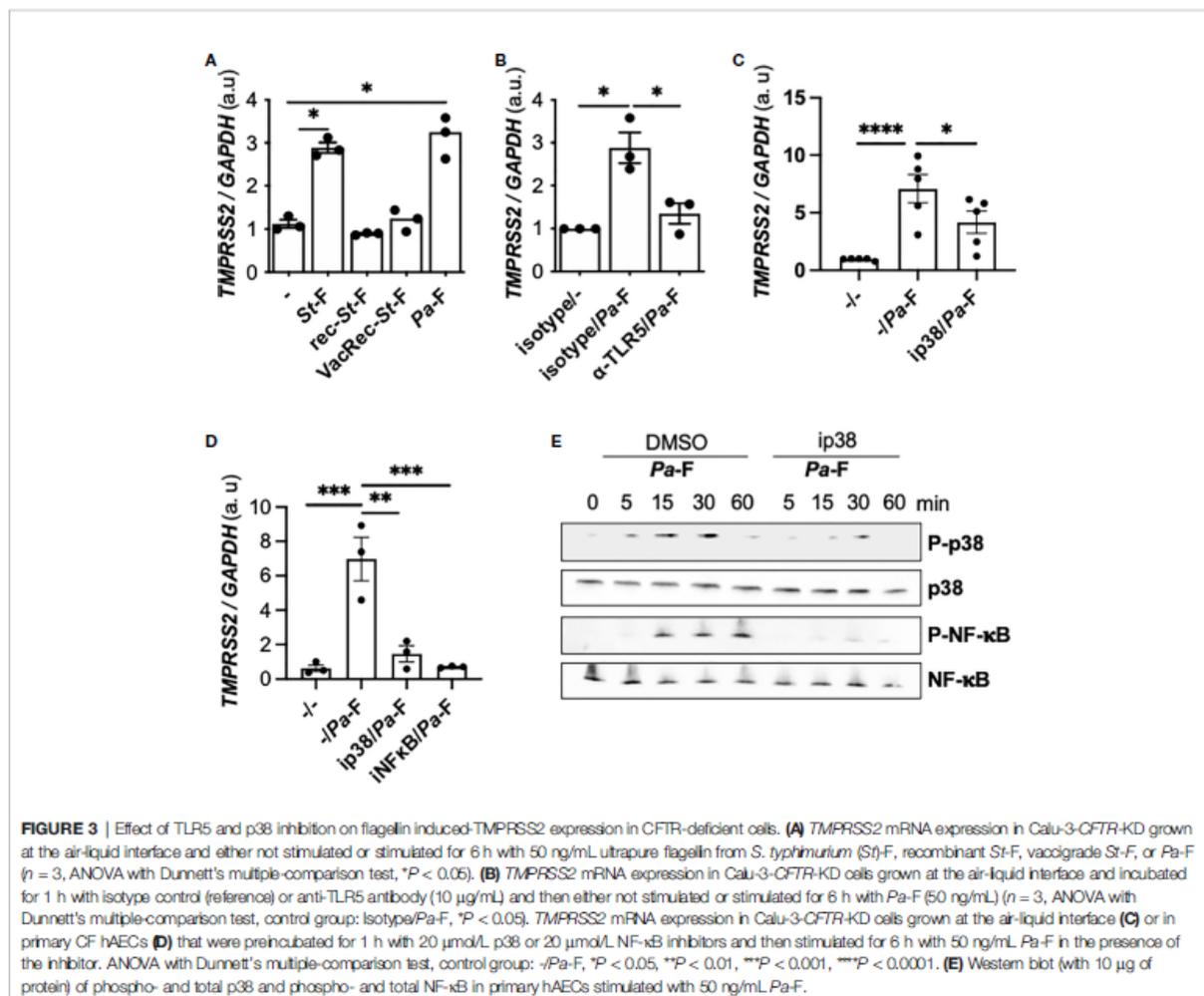
To determine whether *TMPRSS2* induction was restricted to the lung epithelium, we examined the flagellin effect in an intestinal cell line, Caco-2/TC7. Our results showed that flagellins from *P. aeruginosa* and *S. typhimurium*, which were able to induce IL-8 production (Supplementary Figure 3A), exerted no effect on *TMPRSS2* expression in these cells (Supplementary Figure 3B).

Influence of *TMPRSS2* Induction by *P. aeruginosa* Flagellin on SARS-CoV-2 Infectivity in CFTR-Sufficient and -Deficient Calu-3 Cells

Lastly, we investigated whether *TMPRSS2* induction by flagellin influences SARS-CoV-2 infectivity. After infection with SARS-CoV-2, the intracellular *nsp14* viral mRNA level was increased, and this level was significantly higher in Calu-3-CFTR-KD than -CFTR-WT cells and was even more notably elevated when the cells were pre-stimulated with flagellin (Figure 4A). By contrast, the extracellular *nsp14* viral mRNA level, measured in the apical

supernatant of AECs as a surrogate for viral production, was significantly lower in Calu-3-CFTR-KD cells than in Calu-3-CFTR-WT cells (Figure 4B). Whereas pre-stimulation with flagellin did not affect viral-particle release in Calu-3-CFTR-WT cells, a lower, albeit not statistically significant, level of *nsp14* mRNA was measured at the apical side of Calu-3-CFTR-KD cells pre-stimulated with flagellin. To ensure that viral particles

release was not due to an increase in the permeability of the epithelial barrier by flagellin, we measured TEER and observed that flagellin treatment was not associated with a loss of epithelial integrity (Supplementary Figure 4). Lastly, IFN- β and IFN- λ measurements in basal supernatants were not induced either by the virus or the flagellin in the different conditions tested (not illustrated).



DISCUSSION

In this study, we showed that exposure of AECs to flagellin from *P. aeruginosa* induces an increase in TMPRSS2 expression, which is dependent on TLR5 and p38 MAPK activation. Notably, prior exposure of AECs to flagellin results in increased infectivity of SARS-CoV-2 (illustrated in Figure 5).

We found that TMPRSS2 is more expressed in hAECs from pwCF as compared with the level in controls. Although the hAECs were isolated from a limited number of pwCF, this observation agrees with previous results obtained using excised lungs, where RNA *in situ* hybridization revealed that TMPRSS2 expression was higher in pwCF than in non-CF patients (7). We also observed that flagellin from *P. aeruginosa* increases TMPRSS2 expression in primary bronchial cells from both pwCF and controls. The variability of the flagellin-elicited response in the two groups is likely due to the effect of several donor-related factors, such as sex, age, and CF clinical history in the case of pwCF. An age-related increase in TLR5 expression

and sensing has been observed in human monocytes (22). Moreover, the single-nucleotide polymorphism *TLR5* c.1174C>T, which is common in the general population (23) and generates a variant that acts as a modifier gene in CF (24), might also contribute to this variability. Unfortunately, it was not possible to have age-matched donors which constitutes a limitation in our study.

To elucidate the specific contribution of CFTR in the level of TMPRSS2 induction by flagellin, we used isogenic Calu-3-CFTR-WT and Calu-3-CFTR-KD cells. We found that TMPRSS2 is highly induced in Calu-3-CFTR-KD cells, and we further confirmed previous observations indicating that CFTR-deficient bronchial cells show an elevated inflammatory response to flagellin, characterized by increased levels of IL-6 and IL-8 (19). Flagellin is known to activate TLR5 and downstream p38 and NF- κB in Calu-3 cells (21). Confirming these results, TMPRSS2 induction by flagellin was found here to depend on p38 and NF- κB , both in Calu-3 cells and primary CF hAECs. Interestingly, a recent phosphoproteomic study in Vero-

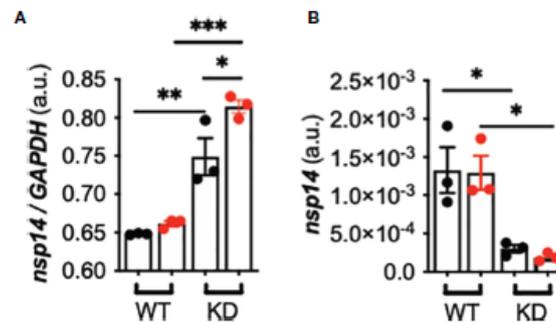


FIGURE 4 | Effect of TMPRSS2 induction by *P. aeruginosa* flagellin on SARS-CoV-2 infectivity in CFTR-deficient Calu-3 cells. **(A)** Intracellular *nsp14*/GAPDH and **(B)** apical (supernatant) *nsp14* mRNA expression in Calu-3-*CFTR*-WT (reference group) and -*CFTR*-KD cells grown at the air-liquid interface and either not stimulated (black circle) or stimulated (red circle) for 16 h with Pa-F 50 ng/mL, and then infected for 24 h with SARS-CoV-2 (multiplicity of infection = 1) ($n = 3$, ANOVA with Bonferroni's multiple-comparison test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

6 cells revealed that SARS-CoV-2 stimulates the p38 pathway, and that pharmacological inhibition of p38 shows antiviral efficacy (25). Thus, this study and our results here suggest that inhibiting the p38 pathway could represent a potential COVID-19 therapy.

The increase in intracellular viral mRNA levels in CF cells exposed to flagellin, which indicates an elevated level of infection, is likely the result of the upregulated expression of TMPRSS2. Accordingly, TMPRSS2 inhibition by using the serine-protease inhibitor camostat mesylate is sufficient for preventing infection with SARS-CoV-2 (10). Intriguingly, we observed a lower level of viral particles at the apical side of CF cells as compared with the

levels in non-CF cells; this could be the result of an increased host-defense capacity of CF cells against viral infection, or a delay in the kinetics of virus release. Interestingly, a recent transcriptomic study shows that despite the fact that influenza virus (IAV) replication in Calu3-*CFTR*-WT and Calu3-*CFTR*-KD cells is similar, a specific immune gene profile is observed in Calu-3-*CFTR*-KD before and after infection with IAV. It is also shown by RNAseq analysis that flagellin stimulation revealed potential dysregulation of pathways involved in viral infection. Importantly, by stimulating cells with IFNs and using a transcription network analysis, they also demonstrated that IFN signaling is altered in CFTR deficient cells (26) which

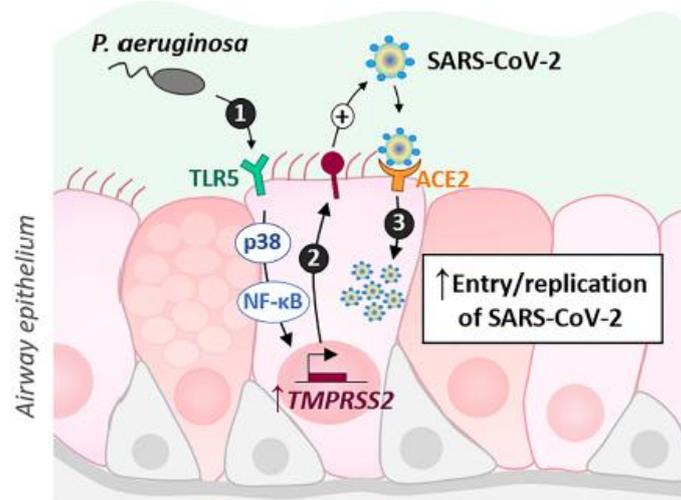


FIGURE 5 | Schematic illustrating the results. *P. aeruginosa* interacts with the airway epithelial cells of pwCF, notably by activating the TLR5 signaling pathway through its virulence factor, flagellin. This activation, dependent on p38 MAPK and NF-κB, leads to an increase in TMPRSS2 which could regulate SARS-CoV-2 infectivity.

could explain in part our results. Future studies specifically investigating infection kinetics, viral-particle release, and the resulting antiviral response including the production of IL-6 and Type I/III interferons should facilitate definitive assessment of whether prior exposure to flagellin induces either a protective or damaging effect after SARS-CoV-2 infection of CF cells. The non-detection of IFN- β and IFN- λ in our viral infection conditions is probably related to the very short infection time chosen, which if it allows to study the initiation of the viral infection process does not allow to study at best the resulting inflammatory response. Indeed, it was shown in Calu-3 cells that SARS-CoV-2 induces a significant but delayed IFN- β in comparison to Sendai virus or synthetic dsRNA (poly I:C) (27).

Further investigations conducted using primary cells differentiated at the air-liquid interface will be necessary to specifically characterize the response of CF bronchial epithelial cells. Nevertheless, the model used here is relevant. As noted in the introduction section, secretory cells are infected by SARS-CoV-2; this was demonstrated in previous studies conducted using single-cell RNA-seq, either *ex vivo* with lung biopsies of patients infected with SARS-CoV-2 (4), or *in vitro* with a reconstituted epithelium at the air-liquid interface (6, 8). Calu-3 cells polarized at the air-liquid interface present the characteristics of secretory cells (mucus production) and express naturally (i.e., without exogenous overexpression) the required proteins (ACE2, TMPRSS2) for infection by SARS-CoV-2, which is not the case with the other epithelial cell lines tested in this study.

Several studies have delineated the antiviral capacity endowed by flagellin against other respiratory viruses, including influenza A (28). Furthermore, flagellin was recently suggested to be capable of modulating the innate immune response and thereby eliminating SARS-CoV-2 and resolving COVID-19 (29). Accordingly, the use of recombinant flagellin as an adjuvant in vaccine development has been considered (30).

However, we observed here that recombinant flagellin (standard or vaccigradeTM) from *S. Typhimurium* did not affect TMPRSS2 expression. Thus, although these data were obtained *in vitro*, it is likely based on the aforementioned finding that pathogen-targeting vaccines developed using recombinant flagellin as an adjuvant will not produce negative effects in the case of concomitant exposure to SARS-CoV-2. Moreover, the observed upregulation of TMPRSS2 expression induced by flagellin appears specific to the lung epithelium, because the effect was not replicated in Caco-2/TC7 cells, which are epithelial cells of intestinal origin. During their lifetime, pwCF are also infected with other flagellated bacteria including *Burkholderia cenocepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia* (31). In particular, flagellin from *Burkholderia cenocepacia* also known to activate TLR5 (32, 33), could also modulate TMPRSS2 expression.

The question of whether CF patients face an increased risk of developing a severe form of COVID-19 is a topical one and a source of discussion (34). Clinical follow-up results obtained to date indicate that pwCF, both adults (3, 35) and children (36), do not show an elevated risk of developing severe COVID-19 as

compared with the general population. However, pwCF with advanced CF disease (associated with older age, CF-related diabetes, lower lung function, having received an organ transplant) might develop a severe clinical course (3, 35).

In a recent French study, we compared the baseline clinical characteristics of 31 pwCF infected by SARS-CoV-2 during the first wave of the pandemic to that of the overall French CF population ($n = 6,913$; >90% of all French CF cases) (37). The pwCF with COVID-19 were found to be older and more frequently chronically colonized with *P. aeruginosa* (37). However, considering the small number of patients, these results must be interpreted with caution. Thus, whether the risk of developing severe COVID-19 is increased in pwCF because of their *P. aeruginosa* infection remains unresolved and will require further meta-analysis performed using international cohorts. Moreover, a recent study including 874 individuals with COVID-19 showed that carriers of CF-causing variants ($N=40$) may be more likely to develop severe COVID-19 (38). This reinforces the interest in studying the specific role of CFTR in the pathogenesis of COVID-19.

In conclusion, we have shown that exposure of CF AECs to flagellin from *P. aeruginosa* can enhance SARS-CoV-2 infectivity. Further clinical follow-up studies and *in vitro* experimental investigations into the mechanisms associated with the specific host response of primary CF cells to SARS-CoV-2 infection should help elucidate this matter and provide insights for future clinical care.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ebi.ac.uk/ena/PRJEB9292>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LG, MR, and OT, designed experiments. MR, JB, CC, VB, OT, AP, JM, MG, JO, conducted the experiments. LG wrote the manuscript. MR, JB, VB, MR-C, HC and OT critically revised the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

LG received a grant from the Faculté de Médecine Sorbonne Université (AAP COVID19).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Marc Chanson (University of Geneva) for generously providing Calu-3-CFTR-WT and Calu-3-CFTR-KD

cells (14), Prof. Dieter Gruenert and Dr. Beate Illek (University of California San Francisco (UCSF)) for 16HBE14o- cells, and Dr. Véronique Carrière (Sorbonne Université/Centre de recherche St-Antoine) for Caco-2/TC7 cell line. This manuscript has been released as a pre-print (39).

REFERENCES

- To T, Viegi G, Cruz A, Taborda-Barata L, Asher M, Behera D, et al. A Global Respiratory Perspective on the COVID-19 Pandemic: Commentary and Action Proposals. *Eur Respir J* (2020) 56(1):2001704. doi: 10.1183/13993003.01704-2020
- Elborn JS. Cystic Fibrosis. *Lancet* (2016) 388(10059):2519–31. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00576-6
- McClenaghan E, Cosgriff R, Browmlee K, Ahern S, Burgel PR, Byrnes CA, et al. The Global Impact of SARS-CoV-2 in 181 People With Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros* (2020) 19(6):868–71. doi: 10.1016/j.jcf.2020.10.003
- Chua RL, Lukassen S, Trump S, Hennig BP, Wendisch D, Pott F, et al. COVID-19 Severity Correlates With Airway Epithelium-Immune Cell Interactions Identified by Single-Cell Analysis. *Nat Biotechnol* (2020) 38(8):970–9. doi: 10.1038/s41587-020-0602-4
- Zhu N, Wang W, Liu Z, Liang C, Wang W, Ye F, et al. Morphogenesis and Cytotoxic Effect of SARS-CoV-2 Infection in Human Airway Epithelial Cells. *Nat Commun* (2020) 11(1):3910. doi: 10.1038/s41467-020-17796-z
- Ravindra NG, Alfajaro MM, Gasque V, Huston NC, Wan H, Szigeti-Buck K, et al. Single-Cell Longitudinal Analysis of SARS-CoV-2 Infection in Human Airway Epithelium Identifies Target Cells, Alterations in Gene Expression, and Cell State Changes. *PLoS Biol* (2021) 19(3):e3001143. doi: 10.1371/journal.pbio.3001143
- Hou YJ, Okuda K, Edwards CE, Martinez DR, Asakura T, Dinnon KH3rd, et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell* (2020) 182(2):429–446 e14. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.042
- Fiege JK, Thiede JM, Nanda HA, Matchett WE, Moore PJ, Montanari NR, et al. Single Cell Resolution of SARS-CoV-2 Tropism, Antiviral Responses, and Susceptibility to Therapies in Primary Human Airway Epithelium. *PLoS Pathog* (2021) 17(1):e1009292. doi: 10.1371/journal.ppat.1009292
- Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The Spike Glycoprotein of the New Coronavirus 2019-nCoV Contains a Furin-Like Cleavage Site Absent in CoV of the Same Clade. *Antiviral Res* (2020) 176:104742. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104742
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Kruger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* (2020) 181(2):271–80.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052
- Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veales D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* (2020) 183(6):1735. doi: 10.1101/2020.02.19.956581
- Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural Basis for the Recognition of the SARS-CoV-2 by Full-Length Human ACE2. *Science* (2020) 367(6485):1444–8. doi: 10.1101/2020.02.19.956946
- Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A Pneumonia Outbreak Associated With a New Coronavirus of Probable Bat Origin. *Nature* (2020) 579(7798):270–3. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7
- Bellec J, Bacchetta M, Losa D, Anegón I, Chanson M, Nguyen TH. CFTR Inactivation by Lentiviral Vector-Mediated RNA Interference and CRISPR-Cas9 Genome Editing in Human Airway Epithelial Cells. *Curr Gene Ther* (2015) 15(5):447–59. doi: 10.2174/156652315666150812115939
- Chantré I, Rodolose A, Barbat A, Dussaux E, Brot-Laroche E, Zweibaum A, et al. Differential Expression of Sucrase-Isomaltase in Clones Isolated From Early and Late Passages of the Cell Line Caco-2: Evidence for Glucose-Dependent Negative Regulation. *J Cell Sci* (1994) 107(Pt 1):213–25. doi: 10.1242/jcs.107.1.213
- Pizzorno A, Padey B, Julien T, Trouillet-Assant S, Traversier A, Errazuriz-Cerda E, et al. Characterization and Treatment of SARS-CoV-2 in Nasal and

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.714027/full#supplementary-material>

- Bronchial Human Airway Epithelia. *Cell Rep Med* (2020) 1(4):100059. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100059
- Balloy V, Varet H, Dillies MA, Proux C, Jagla B, Coppee JY, et al. Normal and Cystic Fibrosis Human Bronchial Epithelial Cells Infected With *Pseudomonas Aeruginosa* Exhibit Distinct Gene Activation Patterns. *PLoS One* (2015) 10(10):e0140979. doi: 10.1371/journal.pone.0140979
- Balloy V, Thevenot G, Bienvenu T, Morand P, Corvol H, Clement A, et al. Flagellin Concentrations in Expectorations From Cystic Fibrosis Patients. *BMC Pulm Med* (2014) 14:100. doi: 10.1186/1471-2466-14-100
- Blohmke CJ, Victor RE, Hirschfeld AF, Elias IM, Hancock DG, Lane CR, et al. Innate Immunity Mediated by TLR5 as a Novel Antiinflammatory Target for Cystic Fibrosis Lung Disease. *J Immunol* (2008) 180(11):7764–73. doi: 10.4049/jimmunol.180.11.7764
- Fleuret I, Lopez-Galvez R, Barbry P, Guillon A, Si-Tahar M, Bahr A, et al. TLR5 Signaling is Hyper-Responsive in Porcine Cystic Fibrosis Airways Epithelium. *J Cyst Fibros* (2021). doi: 10.1016/j.jcf.2021.08.002
- Illek B, Fu Z, Schwarzer C, Banzon T, Jalickee S, Miller SS, et al. Flagellin-Stimulated Cl- Secretion and Innate Immune Responses in Airway Epithelia: Role for P38. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2008) 295(4):L531–42. doi: 10.1152/ajplung.90292.2008
- Qian F, Wang X, Zhang L, Chen S, Peciychna M, Allore H, et al. Age-Associated Elevation in TLR5 Leads to Increased Inflammatory Responses in the Elderly. *Aging Cell* (2012) 11(1):104–10. doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00759.x
- Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, et al. A Common Dominant TLR5 Stop Codon Polymorphism Abolishes Flagellin Signaling and is Associated With Susceptibility to Legionnaires' Disease. *J Exp Med* (2003) 198(10):1563–72. doi: 10.1084/jem.20031220
- Blohmke CJ, Park J, Hirschfeld AF, Victor RE, Schneiderman J, Stefanowicz D, et al. TLR5 as an Anti-Inflammatory Target and Modifier Gene in Cystic Fibrosis. *J Immunol* (2010) 185(12):7731–8. doi: 10.4049/jimmunol.1001513
- Bouhaddou M, Memon D, Meyer B, White KM, Rezelj VV, Correa Marrero M, et al. The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection. *Cell* (2020) 182(3):685–712 e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.034
- Sofoluwe A, Zoso A, Bacchetta M, Lemeille S, Chanson M. Immune Response of Polarized Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells Infected With Influenza A Virus. *J Cyst Fibros* (2020) 20(4):655–63. doi: 10.1016/j.jcf.2020.08.012
- Lei X, Dong X, Ma R, Wang W, Xiao X, Tian Z, et al. Activation and Evasion of Type I Interferon Responses by SARS-CoV-2. *Nat Commun* (2020) 11(1):3810. doi: 10.1038/s41467-020-17665-9
- Georgel AF, Cayet D, Pizzorno A, Rosa-Calatrava M, Paget C, Sencio V, et al. Toll-Like Receptor 5 Agonist Flagellin Reduces Influenza A Virus Replication Independently of Type I Interferon and Interleukin 22 and Improves Antiviral Efficacy of Oseltamivir. *Antiviral Res* (2019) 168:28–35. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.05.002
- Golonka RM, Saha P, Yeoh BS, Chattopadhyay S, Gewirtz AT, Joe B, et al. Harnessing Innate Immunity to Eliminate SARS-CoV-2 and Ameliorate COVID-19 Disease. *Physiol Genomics* (2020) 52(5):217–21. doi: 10.1152/physiolgenomics.00033.2020
- Cui B, Liu X, Fang Y, Zhou P, Zhang Y, Wang Y. Flagellin as a Vaccine Adjuvant. *Expert Rev Vaccines* (2018) 17(4):335–49. doi: 10.1080/14760584.2018.1457443
- Blanchard AC, Waters VJ. Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. *Semin Respir Crit Care Med* (2019) 40(6):727–36. doi: 10.1055/s-0039-1698464
- Urban TA, Griffith A, Torok AM, Smolkin ME, Burns JL, Goldberg JB. Contribution of *Burkholderia Cenocepacia* Flagella to Infectivity and Inflammation. *Infect Immun* (2004) 72(9):5126–34. doi: 10.1128/IAI.72.9.5126-5134.2004

33. de CVGM, Le Goffic R, Balloy V, Plotkowski MC, Chignard M, Si-Tahar M. TLR 5, But Neither TLR2 Nor TLR4, is Involved in Lung Epithelial Cell Response to Burkholderia Cenocepacia. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2008) 54(1):37–44. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00453.x
34. Peckham D, McDermott MF, Savic S, Mehta A. COVID-19 Meets Cystic Fibrosis: For Better or Worse? *Genes Immun* (2020) 21(4):260–2. doi: 10.1038/s41435-020-0103-y
35. Cosgriff R, Ahern S, Bell SC, Brownlee K, Burgel PR, Byrnes C, et al. A Multinational Report to Characterise SARS-CoV-2 Infection in People With Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros* (2020) 19(3):355–8. doi: 10.1016/j.jcf.2020.04.012
36. Bain R, Cosgriff R, Zampoli M, Elbert A, Burgel PR, Carr SB, et al. Clinical Characteristics of SARS-CoV-2 Infection in Children With Cystic Fibrosis: An International Observational Study. *J Cyst Fibros* (2021) 20(1):25–30. doi: 10.1016/j.jcf.2020.11.021
37. Corvol H, de Miranda S, Lemonnier L, Kemgang A, Reynaud Gaubert M, Chiron R, et al. First Wave of COVID-19 in French Patients With Cystic Fibrosis. *J Clin Med* (2020) 9(11). doi: 10.3390/jcm9113624
38. Baldassarri M, Fava F, Fallerini C, Daga S, Benetti E, Zguro K, et al. Severe COVID-19 in Hospitalized Carriers of Single CFTR Pathogenic Variants. *J Pers Med* (2021) 11(6). doi: 10.3390/jpm11060558
39. Ruffin M, Bigot J, Calmel C, Mercier J, Pizzorno A, Rosa-Calatrava M, et al. Flagellin From Pseudomonas Aeruginosa Modulates SARS-CoV-2 Infectivity

in CF Airway Epithelial Cells by Increasing TMPRSS2 Expression. *bioRxiv* (2020). 2020.08.24.264564. doi: 10.1101/2020.08.24.264564

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

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Ruffin, Bigot, Calmel, Mercier, Givélet, Oliva, Pizzorno, Rosa-Calatrava, Corvol, Balloy, Terrier and Guillot. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

II- Annexe 2 : Premières analyses de RNAseq

Nous avons fait analyser par RNAseq des échantillons de cellules épithéliales bronchiques primaires provenant d'un patient mucoviscidose cultivées en interface air-liquide. Ces cellules ont été traitées avec de l' α -methyl-DL-tryptophane (α -MT), ou son véhicule MeOH.

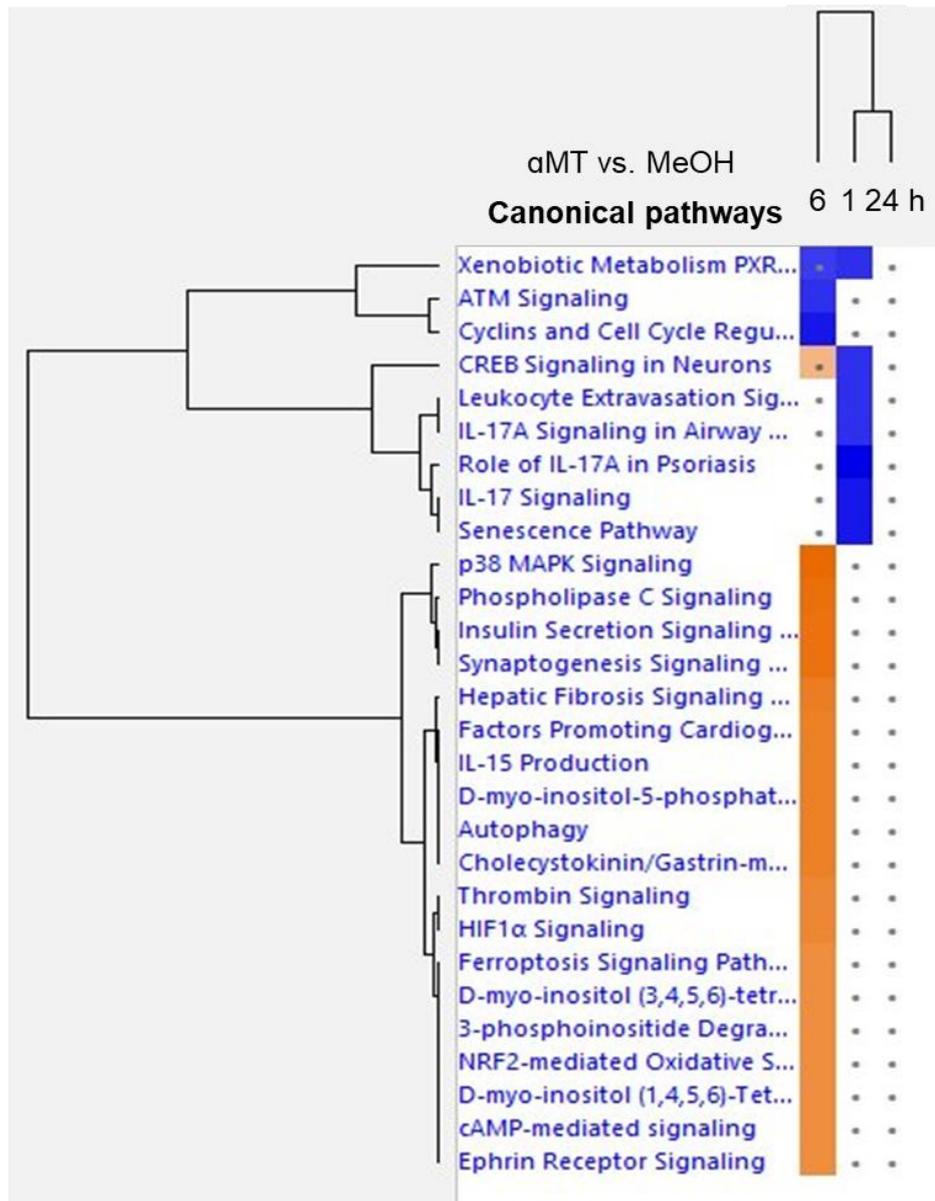


Figure 1. Canonical pathways integrative analysis (significant z-scores>2) overrepresented in CF hBEC incubated 1, 6 and 24 h with α -MT (1mM) in comparison to MeOH (0,87%) control treatment. Orange : activation, Blue: inhibition

Cells

CF primary human bronchial epithelial cells (Epithelix, Plan-les-Ouates, Switzerland) (characteristics in **Table 1**) cultured at air-liquid interface in Mucilair culture medium (Epithelix) were incubated 1, 6 and 24h with 1 mM SLC6A14 inhibitor α -methyltryptophan (α -MT; M8377 was from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) or methanol (MeOH, 0,87%) as a vehicle.

Reference	Sexe	Age	Smoker	<i>CFTR</i> Variant
MD0567	F	39	no	F508del/F508del
MD0519	F	33	no	F508del/F508del
MD0679	F	30	no	F508del/F508del

Table 1. Characteristics of CF primary bronchial cells.

Short Mat et met

The libraries were prepared following the TruSeq Stranded mRNA protocol from Illumina, starting from 400 ng of good quality total RNA (RIN >7). Paired end (2 × 75 bp) sequencing was performed on an Illumina Nextseq 500 platform.

Transcriptomic study

After RNA extraction, RNA concentrations were obtained using nanodrop or a fluorometric Qubit RNA assay (Life Technologies, Grand Island, New York, USA). The quality of the RNA (RNA integrity number) was determined on the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) as per the manufacturer's instructions.

To construct the libraries, 400 ng of good quality total RNA sample (RIN >7) was processed using TruSeq Stranded mRNA kit (Illumina) according to manufacturer instructions. Briefly, after purification of poly-A containing mRNA molecules, mRNA molecules are fragmented and reverse-transcribed using random primers. Replacement of dTTP by dUTP during the second strand synthesis will permit to achieve the strand specificity. Addition of a single A base to the cDNA is followed by ligation of Illumina adapters.

Libraries were quantified by qPCR using the KAPA Library Quantification Kit for Illumina Libraries (KapaBiosystems, Wilmington, MA) and library profiles were assessed using the DNA High Sensitivity LabChip kit on an Agilent Bioanalyzer. Libraries were sequenced on an Illumina Nextseq 500 instrument using 75 base-lengths read V2 chemistry in a paired-end mode.

After sequencing, a primary analysis based on AOZAN software (ENS, Paris) was applied to demultiplex and control the quality of the raw data (based of FastQC modules / version 0.11.5). Obtained fastq files were then aligned using STAR algorithm (version 2.5.2b) and quality control of the alignment realized with Picard tools (version 2.8.1). Reads were then counted using Featurecount (version Rsubread 1.24.1) and the statistical analyses on the read counts were performed with the DESeq2 package version 1.14.1 to determine the proportion of differentially expressed genes between two conditions.

Pathway analysis

Pathway analysis was realized with Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Content version: 62089861, Release Date: 2021-02-17).

Results

Pathway analysis

Top 5 up-regulated genes	Log2FC	padjBH
DNAAF4-CCPG1	21.673	0.006
FAM220A	10.576	0.001
AC006064.6	8.082	0.049
PNCK	3.76	0.046
IGFBP5	3.529	0.046
Top 5 down-regulated genes		
AC018809.3	-6.985	0.038
IL17C	-4.604	0.013
CXCL2	-4.306	0.006
TACR1	-3.930	0.0001
S100A7A	-3.617	0.0129

Table 1. Top 5 upregulated and downregulated genes (Filter: Log2FC) detected in CF hBEC incubated 1 h with α -MT (1mM) in comparison to MeOH (0,87%) control treatment. Padjusted Benjamini and Hochberg

Name	B-H p-value	Z-score	Overlap	Molecules
Role of IL-17A in Psoriasis	4.22E-07	-2.449	42.9 % 6/14	CXCL3,CXCL6,DEFB4A/DEFB4B,S100A7,S100A8,S100A9
Agranulocyte Adhesion and Diapedesis	4.53E-07	NaN	7.1 % 14/197	CD34,CLDN10,CXCL10,CXCL11,CXCL2,CXCL3,CXCL6,IL33,MMP13,MMP28,PECAM1,PODXL2,SELL,SELP
Granulocyte Adhesion and Diapedesis	5.90E-06	NaN	6.9 % 12/174	CLDN10,CXCL10,CXCL11,CXCL2,CXCL3,CXCL6,IL33,MMP13,MMP28,PECAM1,SELL,SELP
IL-17A Signaling in Airway Cells	2.65E-02	-2	7.5 % 5/67	CXCL3,CXCL6,DEFB4A/DEFB4B,IKBKE,PTEN
Pathogenesis of Multiple Sclerosis	4.22E-07	NaN	22.2% 2/9	CXCL10, CXCL11

Table 2. Top 5 canonical pathways overrepresented in CF hBEC incubated 1 h with α -MT (1mM) in comparison to MeOH (0,87%) control treatment.

Name	p-value range	Molecules
Cellular Movement	8.92E-03-8.21E-11	45
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	8.92E-03-7.63E-08	43
Cell Death and Survival	8.92E-03-1.01E-06	48
Cellular Compromise	8.92E-03-3.17E-06	26
Cellular Development	8.92E-03-5.89E-06	50

Table 3. Diseases and Bio functions/Top 5 Molecular and cellular functions overrepresented in CF hBEC incubated 1 h with α -MT (1mM) in comparison to MeOH (0,87%) control treatment.

Top 5 up-regulated genes	Log2FC	padjBH
CASKIN1	3.813	0.0001
SEMA3B	3.507	6.155
FLNC	3.204	8.795
C4orf54	3.194	0.014
AC0793058	3.09	0.011
Top 5 down-regulated genes		
RP11_152H183	-8.187	0.023
CTA-150C2.22	-6.982	0.028
CEMP1	-6.463	0.003
RCC2-AS1	-5.019	1.723e-06
RP11_294J226	-4.756	0.046

Table 4. Top 5 upregulated and downregulated genes (Filter: Log2FC) detected in CF hBEC incubated 6 h with α -MT (1mM) in comparison to MeOH (0,87%) control treatment.

Name	BH p-value	Z score	Overlap	Molecules
Autophagy	1.15E-04	2.236	9.5 % 20/211	ATG9B,BCL2,CREB1,CREB5 ,DAPK3,DDIT3,E2F1,ERN1,F OXO3,IRS2,MAP1LC3B2,PIK 3R3,PLEKHM1,PPP2R2C,PR KAR2B,PRKCQ,PTEN,TGFB 1,TICAM1,ULK1
ILK Signaling	9.12E-04	1.807	8.8 % 17/193	CFL2,CREB1,CREB5,FERMT 2,FLNC,IRS2,ITGB7,ITGB8, MYO10,PIK3R3,PPP2R2C,PT EN,REL,RHOB,RHOF,RHOQ, SNAI1
Insulin Receptor Signaling	9.12E-04	0.302	10.3 % 14/136	FOXO3,GRB10,IRS2,PIK3R3, PPP1R10,PRKAR2B,PTEN,R ASD2,RHOQ,SCNN1B,SCNN 1G,SGK1,SLC2A4,TRIP10
Hepatic Fibrosis Signaling Pathway	1.23E-03	2.294	6.3 % 26/412	BCL2,BRAF,COL1A1,CREB1 ,CREB5,FTL,GLIS2,IKBKE,I L1RAP,IRS2,ITGB7,ITGB8,K DR,LEPR,PIK3R3,PRKAR2B, PRKCQ,PTCH1,PTEN,RASD 2,REL,RHOB,RHOF,RHOQ,S NAI1,TGFB1
Salvage Pathways of Pyrimidine Ribonucleotides	1.05E-02	1.667	10.4% 10/96	APOBEC3B,BRAF,CDK18,M AP3K9,MAPK6,NME1,PIM1, PRKCQ,SGK1,UPP1

Table 5. Top 5 canonical pathways overrepresented in CF hBEC incubated 6 h with α -MT (1mM) in comparison to MeOH (0,87%) control treatment.

Name	p-value range	Molecules
Cell Death and Survival	3.43E-03-3.23E-09	137
Gene Expression	1.76E-03-3.75E-08	115
Cellular Development	3.40E-03-8.39E-07	141
Cellular Growth and Proliferation	3.40E-03-8.39E-07	131
Post-Translational Modification	1.02E-03-1.25E-06	37

Table 6. Diseases and Bio functions/Top 5 Molecular and cellular functions overrepresented in CF hBEC incubated 6 h with α -MT (1mM) in comparison to MeOH (0,87%) control treatment.

Top 5 up-regulated genes	Log2FC	padjBH
RP11_70C13	8.066	0.004
AC1045322	7.03	0.029
RNU1-1	6.65	5.357e-06
RNU1-2	6.65	5.357e-06
RNU1-27P	6.65	5.357e-06
Top 5 down-regulated genes		
H2AC18/H2AC19*	-22.471	3.315e-09
RASD1	-5.531	0.002
IL17C	-5.074	0.003
SPRY4	-3.752	0.0002
XXbac-BPG32J3.22	-3.689	0.020

Table 7. Top 5 upregulated and downregulated genes (Filter: Log2FC) detected in CF hBEC incubated 24 h with α -MT (1mM) in comparison to MeOH (0,87%) control treatment.

Name	BH p-value		Overlap	
Systemic Lupus Erythematosus Signaling	0.00000537	NaN	2.1 % 8/389	RASD1,RNU1-1,RNU1-2,RNU1-27P,RNU1-28P,RNU1-3,RNU1-4,RNVU1-18
Coronavirus Pathogenesis Pathway	>0.05	NaN	1.5 % 3/195	RN7SL1,RN7SL2,RNU1-1
Pyridoxal 5'-phosphate Salvage Pathway	>0.05	NaN	3.1 % 2/65	MAP3K8,PLK1
ERK5 Signaling	>0.05	NaN	2.8 % 2/72	MAP3K8,RASD1
ErbB Signaling	>0.05	NaN	2.2 % 2/93	EREG,RASD1

Table 8. Top 5 canonical pathways overrepresented in CF hBEC incubated 24 h with α -MT (1mM) in comparison to MeOH (0,87%) control treatment.

Name	p-value range	Molecules
Cell Death and Survival	4.83E-02 - 9,15E-05	9
Cellular Development	3.91E-02 - 1,13E-04	9
Cellular Growth and Proliferation	3.91E-02 - 1,13E-04	9
Carbohydrate metabolism	1.20E-02 - 1,34E-03	1
Cellular assembly and Organization	4.45E-02 - 1,34E-03	6

Table 9. Diseases and Bio functions/Top 5 Molecular and cellular functions overrepresented in CF hBEC incubated 24 h with α -MT (1mM) in comparison to MeOH (0,87%) control treatment.

Role of SLC6A14 in cystic fibrosis lung pathophysiology

Cystic fibrosis (CF) is due to *CFTR* gene pathogenic variants and has no curative treatment to date. The main cause of morbidity and mortality in CF patients is respiratory failure, due to cycles of infection and inflammation responsible for progressive lung tissue degradation.

Although CF is a monogenic disease, lung disease severity varies among patients carrying the same *CFTR* variants. This is partly explained by other genetic factors called "cystic fibrosis modifier genes".

In this study, we focused on a particular modifier gene, *SLC6A14*, which have been shown to be associated with CF digestive and lung disease severities. We were able to demonstrate that the G allele of the rs3788766 variant, located in the promoter sequence of *SLC6A14*, is associated with lung function decline as well as a decrease of *SLC6A14* promoter activity. We then focused on its role in lung pathophysiology. We showed that *SLC6A14* is involved in mTOR signaling and that it favors bronchial epithelial repair. We also studied *SLC6A14* expression and function regulation in CF inflammatory and infectious contexts. Our results indicate an induction of *SLC6A14* expression following IL-1 β and *Pseudomonas aeruginosa* exposure. Interestingly, we identified LasB, a protease secreted by *P. aeruginosa*, as capable of cleaving *SLC6A14*.

Thus, this work contributes to new knowledge acquisition on *SLC6A14* as a CF modifier gene, which is essential for a better understanding of the disease and for the development of new therapeutic approaches. In this sense, our results highlight the rs3788766 impact and the host-pathogen interactions existing within the CF patients' bronchial epithelium.

Key words: Cystic fibrosis – SLC6A14 – modifier gene – infection/inflammation –bronchial epithelial repair – *Pseudomonas aeruginosa*

Rôle de SLC6A14 dans la physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose

La mucoviscidose est due à des variants pathogènes du gène *CFTR* et ne dispose d'aucun traitement curatif à ce jour. La principale cause de mortalité des patients atteints de mucoviscidose est l'atteinte pulmonaire, caractérisée par des cycles d'infections et d'inflammation menant, à terme, à une insuffisance respiratoire. La sévérité de la maladie est variable selon les patients porteurs des mêmes variants de *CFTR*. Cela s'explique en partie par d'autres facteurs génétiques appelés « gènes modificateurs ».

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés au gène *SLC6A14*, dont certains variants sont associés à une aggravation des atteintes respiratoires de la mucoviscidose. Nous avons pu démontrer que l'allèle G du variant rs3788766, localisé dans la séquence promotrice de *SLC6A14*, est associé à un déclin de la fonction respiratoire ainsi qu'à une diminution de l'activité du promoteur de *SLC6A14*. Nous avons montré que *SLC6A14* est impliqué dans la voie de signalisation mTOR et favorise la réparation épithéliale bronchique. L'expression et la fonction de *SLC6A14* sont modulées en réponse à la cytokine IL-1 β et à l'infection par *Pseudomonas aeruginosa*, contextes inflammatoire et infectieux caractéristiques de la mucoviscidose.

L'apport de nouvelles connaissances sur le gène modificateur *SLC6A14*, qui fait l'objet de recherches depuis peu, est essentiel à une meilleure compréhension de la maladie ainsi qu'au développement de nouvelles pistes thérapeutiques. En ce sens, ce travail apporte un nouvel éclairage sur l'impact du variant rs3788766 et sur les interactions hôte-pathogène existant au sein de l'épithélium bronchique des patients atteints de mucoviscidose.

Mots-clés : Mucoviscidose – SLC6A14 – gène modificateur – infection/inflammation – réparation épithéliale bronchique – *Pseudomonas aeruginosa*