



HAL
open science

Inhibition de la voie ATF6 de la réponse aux protéines mal formées comme nouvelle approche thérapeutique dans le cadre de la mucoviscidose

Raphaël Santinelli

► **To cite this version:**

Raphaël Santinelli. Inhibition de la voie ATF6 de la réponse aux protéines mal formées comme nouvelle approche thérapeutique dans le cadre de la mucoviscidose. Biologie cellulaire. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2024. Français. NNT : 2024BRES0009 . tel-04631996

HAL Id: tel-04631996

<https://theses.hal.science/tel-04631996>

Submitted on 2 Jul 2024

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.

Ce projet de thèse a été effectué sous la direction du Docteur Pascal Trouvé au sein de l'unité Inserm UMR 1078.

Ce projet a pu être réalisé grâce au soutien financier de Brest métropole et de l'association Gaétan Saleün.



Remerciements

Tout d'abord je souhaite remercier les membres de mon jury qui ont accepté et pris le temps d'évaluer mes travaux de recherches. Je remercie le Pr. Frédéric Becq et le Dr. Olivier Tabary pour avoir pris le temps d'examiner ce manuscrit de thèse. Je souhaite également remercier le Dr. Christelle Coraux, le Dr. Fabienne Foufelle d'avoir accepté d'être examinatrices de ma soutenance de thèse.

Je souhaite remercier le Dr. Emmanuelle Génin d'avoir accepté de présider mon jury de soutenance de thèse, et pour m'avoir permis d'effectuer ce projet de recherche au sein de son laboratoire.

Je remercie les financeurs de ce projet de thèse, Brest métropole ainsi que l'association Gaétan Saleün, sans lesquels ce projet n'aurait pas pu voir le jour.

De plus, je souhaite remercier l'association Gaétan Saleün et son président René Vigouroux de m'avoir donné accès à un hébergement, plus que providentiel, lors de mon arrivée à Brest, ainsi que pour le financement de trois mois supplémentaires à la fin de mon contrat doctoral. Merci à Marie-Aude pour son implication dans cette association, et qui participe activement à entretenir le caractère essentiel d'une telle structure dans l'avancée des recherches sur la mucoviscidose.

A mon directeur de thèse Pascal Trouvé, merci infiniment. Rien de tout ça n'aurait été possible sans toi. Merci d'avoir cru en mes capacités dès mon arrivée en M2, malgré un dossier, disons-le, loin d'être attrayant. Ces trois années m'ont littéralement transformé sur bien des aspects, j'imagine que ça fait partie du but recherché à la fin d'une thèse mais tu y es pour beaucoup. Que ça soit par l'apprentissage d'une rigueur scientifique, d'un esprit critique ou l'apprentissage visant à maîtriser les limites de la loi du « large ! », le petit jeune d'il y a trois ans est bien différent du un peu moins jeune d'aujourd'hui. Toutes ces réunions oxygénées, fortes de discussions (parfois) scientifiques, qui ont ponctuées notre quotidien pendant ces années vont me manquer. Mais (oui tu as horreur de celui-là) si tu me cherches tu sauras sûrement où me trouver, dans un petit établissement irlandais à lancer des balles dans des gobelets contenant un fond de boisson à bulles. Je te souhaite le meilleur pour la suite, et ne t'en fais pas pour moi tu m'as donné toutes les cartes pour mener à bien la suite de ma carrière.

Je souhaite remercier le Pr. Tristan Montier. Merci à vous notamment pour votre soutien financier au quotidien qui m'a permis de produire bon nombre de résultats pendant ce projet de thèse. Merci également de votre soutien et de votre bienveillance vis-à-vis de l'association Dakodoc. Grâce à vous, nous avons pu et les prochains pourront continuer de faire rayonner le travail des doctorants de l'UBO auprès du grand public. Je vous souhaite le meilleur concernant le futur de l'équipe GTCA, en espérant que la suite soit pleine de belles découvertes et

d'avancées scientifiques. Je souhaite également vous remercier sincèrement pour le contrat de trois mois supplémentaires que vous m'avez accordé, lequel m'a permis de finir ce projet sereinement, merci pour votre confiance.

Un grand merci à Nath' alias « western-sama », sans qui je serais sûrement en train de me cogner la tête contre des murs dans un établissement à possibilités de sorties réduites. Merci pour ton aide et tous tes précieux conseils. Sincèrement, je ne sais pas comment j'aurais fait si tu ne m'avais pas autant aidé, notamment dans les dernières lignes droites. J'espère que ton projet de gîte, même si je n'ai pas de doute, sera une franche réussite. A mon avis ça sera toujours plus reposant que de se casser la tête sur ces *** d'acteurs de l'autophagie. Bon courage avec notre Bazire national, chorégraphe, volleyeur et buveur de café de l'extrême. Merci à vous deux, collègues de bureau, pour toutes ces tranches de rigolades qu'on a pu avoir entre deux westerns et lecture d'articles.

Merci Mathieu pour tes conseils et ton soutien notamment à mes débuts d'apprenti thésard et à mes débuts de profs. En parlant de profs, je te souhaite bon courage pour la masse de cours et de corrections que tu dois abattre chaque année. En espérant que tes prochaines recherches te mènent à de chouettes découvertes.

Hugo dit « le grand » aka « le claquettiste fou », compagnon de thèse, de galères, de descente de rivières maltées ou encore d'aventures. Ces trois années auraient été bien différentes sans ta rencontre. Qu'aurait été le quotidien sans ces nombreuses discussions post-Dub durant jusqu'au petit matin, ponctuées par les interventions impromptues d'un certain voisin qualifiable de « sacrément chiant ». J'ai qu'une chose à dire : t'es flamboyant mon pote. Oh, allez petite deuxième chose : on s'fait un Mage Knight ?

Et à Raphie, la plus ponctuelle des Raph (c'est faux désolé, mais on t'aime quand même). Merci, Docteur Youf, pour ton soutien, tous les petits tips de fin de thèse, pour ta bonne humeur et pour toutes nos discussions passionnantes. Avec toi et Hugo, le perudo n'a plus aucun secret pour nous.

Merci à vous pour tous ces moments passés ensemble, qui ont participé grandement à rendre ces années inoubliables. Même si je suis certain que nos chemins ne se séparent pas ici, je vous souhaite le meilleur à vous deux. Que ça soit en Allemagne ou n'importe où sur ce gros caillou qu'on appelle la Terre.

Merci à Tanguy le « DJ fou » ou « Mr l'Ambassadeur ». Heureusement que tu as eu ton poste d'ingénieur, car je pense que le labo se serait effondré avec ton départ. Bientôt la thèse pour toi peut-être, ça sera un pas supplémentaire vers la direction de l'unité ! Merci, Mr Côtes-d'Armor, de mettre l'ambiance dans le labo au rythme de tes semelles claquantes.

Merci Rosy pour toute l'aide que tu as pu m'apporter pendant ces dernières au labo. Merci aussi pour tous les moments hors travail qu'on a pu partager. Je te souhaite bon courage

avec ces animaux de Tanguy et Xavier. Fais attention à toi mais, surtout, fait attention à ces put**** d'escalier.

Merci à Yann, pour ton accessibilité et toute la bienveillance dont tu as pu faire preuve dès mon arrivée. Merci pour toutes ses soirées remplis de discussions passionnantes, et de dégustations de whisky sacrément goûtus. Hâte de te revoir en terre bretonne, loin de la grisaille parisienne.

Tanguy, Rosy, Raphie, Yann, mes chers Goélands, vous faites partie des premières personnes avec qui j'ai échangé en-dehors du labo lors de mon arrivée en terre bretonne. C'est en grande partie grâce à vous que j'ai pu m'intégrer aussi vite dans l'équipe (et que j'ai pu découvrir nombre d'établissements pour faire le plein de vitamines houblonnées). Merci pour toute votre aide, votre soutien moral et tous les fous rires que l'on a pu avoir. Merci d'être à l'origine du pouvoir de « GTCA forever ».

Merci à Xavier, aussi nommé « Bébou ». Petit stagiaire devenu grand thésard. Bon courage pour la suite dans cette aventure scientifique. Accroche-toi et je suis certain que tu produiras une thèse de qualité (tu as déjà bien commencé). Il faudra encore sûrement subir quelques western CFTR, mais il le faut, c'est le métier qui rentre il paraît. Ravi de t'avoir rencontré au cours de ces trois années. Mais c'est loin d'être fini, car comme on dit entre bouffeur de carte graphique : « A plus en LAN ! ».

Merci à Manh. Même si nous n'avons pas échangé autant que ces années passées depuis ton arrivée auraient pu le permettre, j'ai beaucoup apprécié les quelques soirées où l'on a pu discuter. Merci également de nous avoir fait découvrir quelques-unes de tes traditions culinaires. Bon courage pour la dernière ligne droite, et bonne continuation pour la suite.

Merci à Hugo dit « le petit » aka « le démon ». C'était pas gagné au début (RIP la serpillère), mais au final qu'aurait été cette thèse sans t'avoir rencontré. Grâce à toi, je pense que l'on a pu faire un tour du monde sans bouger du Hamilton ou du Dub avec tous les mètres de Baby Guinness enfournés. Je n'ai toujours pas eu le plaisir de voir tes talents de MJ, mais quelque chose me dit que cette histoire n'est pas finie, et que le chômage va prendre une tournure de JDR intensif sous l'égide de lancer de dés/bières/saucissons.

Merci à Ilias. Encore une belle personne avec qui j'ai pu partager bon nombre de mes centres d'intérêts. Ravi d'avoir pu partager avec toi mes pétages de plombs sur LoL, ces sessions de jeux de sociétés, ces (nombreuses) soirées, et, par-dessus tout, la fièvre du JDR. Promis on va lancer les dés quand tu rentreras du Japon, pas sûr qu'on finisse la campagne mais j'ai plein d'autres idées dans ma besace.

Merci à Marion et Romain pour n'avoir raté aucune occasion de bien se marrer. Bravo à Marion d'avoir pu supporter tous les délires foireux qu'on a pu avoir avec Romain (FLASH !).

Docteurs, un plaisir de vous avoir rencontré, et à bientôt devant une « petite bière ?!»

Merci à Anthony pour ces différentes sessions de gaming et pour ces pauses bien méritées entre deux manips au niveau de l'abri à vélo. Un plaisir d'avoir pu partager avec toi ces différentes soirées malgré ton rythme de travail hallucinant. On se retrouve bientôt en terrasse, et on saura qu'on pourra prendre directement la bouteille de Baileys.

Merci à la team ECLA Danielle, Gwennina, Benoît, Enora, Solène, Eloïse, Clara et Abraham (pardon si j'en oublie, vous êtes beaucoup). Plus particulièrement, à Benoît « el presidente » merci pour ton mandat à Dakodoc et pour ton aide précieuse lorsque j'ai pris ta suite. Merci également à Enora et Solène d'avoir et d'être aussi impliquées dans cette asso. On a pu réaliser des trucs très chouettes, et la relève est bien assurée.

Merci à Lénaïg « Présidente ! ». Ta bonne humeur, ta positivité, ta détermination et j'en passe... Change rien, t'es quelqu'un de super. Je n'ai aucun doute pour l'asso avec toi pour tenir les rênes. Et promis, je te tiens au courant pour les sessions de JDR depuis le temps qu'on en parle.

Merci à Maël. Arrivé depuis peu dans l'unité mais avec qui le courant est passé très rapidement et facilement. C'est toujours aussi cool de passer du temps avec toi, on se reverra au tournoi de volley à Ouessant et j'espère avant autour d'un p'tit verre.

Un grand merci à Ahmed, même si je doute que tu lises ces lignes. Colloc' d'un temps, tu es la première personne avec qui j'ai réellement échangé à mon arrivée. Merci à toi pour toutes ces discussions, ces bons délires et de m'avoir fait découvrir la ville. J'espère que tout roule pour toi et te souhaite le meilleur pour la suite.

Aux amis rémois, ou vieilles connaissances, toujours aussi présents malgré la distance :

Georges, plus de quinze piges qu'on se connaît. Même si notre amitié n'avait pas l'air évidente la première année (en sixième quand même hein), tu fais partie aujourd'hui des personnes avec qui je suis le plus proche. Comment on aurait pu deviner il y a quinze ans, encore boutonneux et avec pas mal de centimètres en moins (enfin moi, toi t'étais déjà vachement grand), que j'allais un jour écrire ce genre de message dans un bouquin pareil ? Merci d'avoir toujours été là, et merci pour cette amitié qui est loin d'être terminée. PS : ne te tue pas trop à la tâche au taff, j'ai encore besoin de toi pour la suite de ma vie.

Merci à Raph 2 (ou 1 comme tu veux) alias « Juif » (mais pourquoi à la fin ?), qui est aussi ce qu'un être humain puisse le plus possible se rapprocher d'un Jukebox ambulancier (barde TMTC). C'est pas les choses qui manquent à dire, mais je vais juste te demander de pas te faire graille par un croco, un boa ou n'importe quelle autre saloperie que tu pourras rencontrer dans tes escapades aventurières. Merci pour tout mec, on se revoit bientôt pour exploser les records mondiaux de conneries déblatérées à la minute. Après tout, c'est les Raph (x2), on est là pour

ça.

A Benoît « le stremon du deadlifting ». Encore une belle personne sur laquelle j'ai pu compter durant ces dernières années. On aura, je l'espère, plus de temps désormais pour se refaire des trucs, comme par exemple enfin finir cette session de Layer of Fear avec ton italien préféré. Malheureusement, je n'ai pas pu rattraper tes perfs à la salle, mon vieux dos (et surtout la fin de thèse) ayant eu raison de moi. Ce n'est que partie remise !

Merci à Boro, discret mais toujours présent. Merci pour toutes ces bonnes barres, ces séances de gaming au juste de discussion en vocal et pour le soutien moral. Hâte d'être plus dispo pour retrouver un peu de cette vie rémoise d'avant, histoire de repartager plus de moments « IRL » que via le (bien pratique, il faut le dire) Discord.

Merci à Roux et Lucie. Même si depuis que vous êtes partis à l'Est et moi à l'Ouest, nous avons échangé un peu moins, vous avez toujours une place bien particulière dans mon petit cœur de Palouf. Pardon de pas avoir pu être présent pour ces quelques fois où la thèse et tout ce qui en découle m'ont empêché de vous retrouver. A charge de revanche, je viendrais enfin vous voir dans votre contrée de l'Est.

Merci à Manon, « la naine d'Auvergne ». La bonne humeur incarnée. Je pense que je vais suivre ton exemple et aller me paumer au fin fond des montagnes histoire de vivre en autarcie loin de ce monde de dingue, avec quelques chèvres pour lancer ma production de fromage Franco-italien. Je viendrai bientôt dans ton coin pour faire du repérage.

Merci à Jo, le pilier du Discord. Toujours présent pour du gaming, merci pour toutes ces sessions, et ma que c'est pas fini ! Enfin, si t'arrive à toujours à supporter mes pétages de plombs sur la league. On s'fait une teufeuteu ?

Merci aussi à Aliaume, quasi colloc' pendant nos années rémoises. En attendant que tu lâche un peu PoE pour se refaire des sessions de gaming de folie, on va se réorganiser des bonnes grosses soirées de familles dans ta magnifique baraque (un bon gros gg au passage) avec barbecue accompagné de liqueurs diverses et variées (c'est pour manger équilibré hein).

Merci à Dylan, compagnon de jeu idéal. Présent quasi quotidiennement pour faire chauffer le PC, sur des jeux plus ou moins chills (juré un jour on passera plat' sur le fameux jeu en bêta). Prépare ton matos vidéo ludique, la thèse c'est fini on a du travail qui nous attend.

Merci à Anna, sûrement une des plus belles rencontres que j'ai faites dans ma vie. Merci pour tes visites régulières (avec cette motivation de se taper les 12h de trajet en bus) qui m'ont été si précieuses pour que ces trois ans se passent au mieux. Merci pour ton soutien, ton rire, toutes ces discussions, bref merci d'être la personne que tu es. Maintenant que j'ai un peu plus de temps avec la fin de cette « petite » étape qu'est la thèse, j'espère qu'on pourra retrouver un peu de ce quotidien que l'on avait lorsque j'étais encore à Reims.

Au moment où ces lignes sont écrites, la soutenance n'est toujours pas passée. J'espère donc vraiment vous y retrouver parce que, même si ça commence à faire un sacré bout de temps qu'on se connaît, ça vous permettra de voir au moins une fois que je peux être sérieux.

A mon frangin, Jbouille le bien nommé « vieille banche ». Tu y crois toi, voir ton nom sur ce bouquin qui ressemble à un bottin ? Je suis pas sûr que les petits gars que nous étions, plutôt occupé à jouer à la Play ou monopoliser l'ordinateur familial pour saigner quelques chefs-d'œuvre de notre temps, se doutaient un jour qu'on en arriverait là. Merci à toi, grand frère, d'être et d'avoir toujours été une de mes plus grandes sources d'inspiration.

'Pa et 'Man (oui apparemment votre fils n'a pas encore intégré l'utilisation de mots multi syllabique) merci pour tout. Certes, factuellement sans vous je n'aurai jamais pu en être là aujourd'hui, mais votre soutien et amour indéfectible ont fait la personne que je suis maintenant. Votre « bibichon » a bien grandi, et l'adulte qu'il est maintenant a atteint un de ses rêves d'enfant, merci infiniment pour qui vous êtes et ce que vous m'avez apporté.

A vous, parents et JB, je ne le vous dis pas assez mais j'ai une chance inouïe de vous avoir, je vous aime.

A toi qui as lu ces lignes jusqu'ici pour voir apparaître ton nom, mais qui ne l'a pas trouvé. Pardon si je t'ai oublié, rien de personnel. D'une manière ou d'une autre tu as dû participer à rendre cette expérience inoubliable, donc merci à toi.

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	9
Listes des abréviations.....	12
Table des illustrations.....	14
Préambule.....	16
Introduction	17
I. Synthèse et maturation des protéines.....	17
A. Généralités	17
B. Le réticulum endoplasmique granuleux.....	18
1. Biosynthèse des protéines.....	18
2. Contrôle qualité lié au réticulum endoplasmique	22
a. Le repliement des protéines	22
b. Les protéines chaperons	23
3. Description succincte du système de dégradation des protéines, lié au réticulum endoplasmique.....	26
C. Transport conventionnel des protéines	27
1. La sortie du réticulum endoplasmique.....	27
2. Le transport jusqu'à l'appareil de Golgi.....	29
3. L'appareil de Golgi.....	30
a. Généralités	30
b. Les modifications post-traductionnelles	31
II. La réponse aux protéines mal formées	36
A. Principales fonctions et facteurs d'induction de la réponse aux protéines mal formées.....	36
B. Acteurs moléculaires principaux	37
1. Grp78.....	37
a. Structure.....	37
b. Fonctions.....	38
2. IRE1	40
3. PERK	42
4. ATF6.....	43
a. Activation et fonction de ATF6	43
b. Site-1 protease.....	44
C. L'apoptose déclenchée par la réponse aux protéines mal formées.....	45
D. Pathologies.....	47

1.	Maladies métaboliques et diabète	48
2.	Maladies inflammatoires.....	49
3.	Cancers	50
4.	Maladies neurodégénératives.....	50
III.	Autophagie.....	52
A.	Généralités	52
B.	Processus de formation des autophagosomes	53
1.	Initiation.....	53
2.	Nucléation et élongation	54
a.	Lieu de formation des phagophores	54
b.	Complexe PI3KC3	58
c.	LC3	59
3.	Fermeture.....	60
4.	Fusion	61
IV.	La mucoviscidose	62
A.	Généralités	62
B.	CFTR	67
1.	Structure et activation	67
2.	Synthèse et maturation.....	68
3.	Fonctions	70
a.	Canal ionique	70
b.	Régulation d'autres canaux ioniques	71
C.	p.Phe508del-CFTR.....	72
1.	Généralités	72
D.	Atteintes systémiques	76
1.	Respiratoires	76
2.	Digestives	77
3.	Génitales	78
E.	Traitements	78
1.	Traitements asymptomatiques	78
2.	Transplantation pulmonaire	80
3.	Thérapies protéiques	81
a.	Correcteurs.....	81
b.	Potentiateurs.....	82
c.	Stabilisateurs.....	82

d. Amplificateurs	82
e. Principales thérapies protéiques combinées.....	83
4. Thérapie par miARN	84
5. Thérapie génique	85
6. PF-429242	85
Problématique de thèse.....	87
Résultats	88
I. Evaluation de l'effet de l'inhibition de la sérine protéase S1P sur la restauration des efflux d'ions Cl ⁻ lié à l'augmentation d'expression du canal p.Phe508del-CFTR.....	88
II. Etude du mécanisme moléculaire menant au transport membranaire du p.Phe508del-CFTR suite à l'inhibition de la S1P.....	122
Conclusion et perspectives	159
Bibliographie.....	164
Annexes	193

Listes des abréviations

-A-

ADP : Adenosine diphosphate

AMP : Adenosine monophosphate

AMPK : Adenosine monophosphate Kinase

ATP : Adenosine triphosphate

Arf1 : ADP-ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor 1

ASK1 : Apoptosis signal-regulating Kinase 1

ATF : Activating transcription factor

ATG : Autophagy-related gene

-B-

BCL-2 : B-cell lymphoma 2

-C-

CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CHOP : CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-homologous protein

Cl⁻ : Ions chlorure

CNX : Calnéxine

COPI/II : coatomer protein I/II

CRT : Calréticuline

-D-

DR5 : Death receptor 5

-E-

EDEM : ER-degradation enhancing α -mannosidase-like protein

eIF2 : Eukaryotic translation initiation factor-2

ENaC : Epithelial sodium channel

ERAD : Endoplasmic reticulum-associated degradation

ERES : Endoplasmic reticulum exit sites

ERGIC : ER-Golgi-intermediate compartment

ESCRT : Endosomal sorting complex required for transport

-F-

FDA : Food and Drug Administration

FIP200 : focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa

-G-

GABARAP : GABA type 1 receptor-associated protein

GADD34 : growth arrest and DNA-damage-inducible protein 34

GRASPs : Golgi reassembly-stacking proteins

Grp78/BiP : 78 kDa glucose-regulated protein/Binding-immunoglobulin protein

Grp94 : 94 kDa glucose-regulated protein

GTP : Guanosine triphosphate

-H-

Hsp : Heat shock proteins

-I-

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

IRE1 α/β : Inositol-requiring enzyme 1 α/β

-J-

JNK1 : c-Jun-N-terminal Kinase 1

-L-

LAMP-1/2 : Lysosome-associated membrane glycoprotein 1/2

LC3 : Microtubule-binding protein-1
Light-Chain-3

LIR : LC3-interacting region

-M-

M6PR : Mannose-6-phosphate receptor

mTOR : Mammalian target of rapamycin

-N-

NBD/NBD (1/2) : Nucleotid Binding
Domain (1/2)

-O-

uORFs/dORFs : Upstream/downstream
open reading frames

-P-

PAS : Phagophore assembly sites / Pre-
autophagosomal structure

PE : Phosphatidyléthanolamine

PDI : Protein disulfide-isomerase

PERK : Protein kinase R (PKR)-like
endoplasmic reticulum kinase

PF : PF-429242

PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinase

PI3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate

-R-

Rab : Ras-related protein

RD : Regulatory domain

RE : Reticulum endoplasmique

RIDD : Regulated IRE1-dependant decay

-S-

Sar1 : Secretion-associated RAS-related 1

SAT : Séquence d'arrêt de transfert

SBD : Substrate binding domain

SEL1L : Suppressor of lin-12-like protein
1

SNAREs : N-ethylmaleimide-sensitive
factor adaptor protein receptors

SREBP : Sterol regulatory element-
binding protein

SRP : Signal recognition particle

S1/2P : Site-1/2 Protease

-T-

TMD1/2 : Transmembrane Domains 1/2

TRAF2 : Tumor necrosis factor (TNF)
receptor-associated factor 2

TRIM16 : Tripartite motif-containing
protein 16

-U-

UGT1 : UDP-glucose : glycoprotein
glucosyltransferase 1

ULK1 : Unc-51-like kinase 1

UPR : Unfolded protein response

UPS : Unconventional protein secretion

-X-

XBPI : X-box-binding protein 1

-V-

VAMPs : Vesicle-associated membrane
proteins

VCP : Valosin-containing protein

VEMS : Volume expiratoire maximale par
seconde

VIMP : VCP-interacting membrane
protein

Vps : Vacuolar protein sorting

-W-

WIPI : WD repeat domain
phosphoinositide-interacting protein

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma représentant la translocation co-traductionnelle des protéines sécrétées. ..	19
Figure 2 : Schéma représentant la translocation co-traductionnelle des protéines membranaires de type I.	20
Figure 3 : Schéma représentant la translocation co-traductionnelle des protéines membranaires de type II et de type III.	21
Figure 4 : Schéma représentant la translocation co-traductionnelle d'une protéine membranaire de type IV-A.	22
Figure 5 : Schéma représentatif de la cupule glucidique ajoutée pendant le processus de N-glycosylation sur un peptide en cours de synthèse dans le réticulum endoplasmique	25
Figure 6 : Schéma représentant les différentes étapes du contrôle qualité du RE et d'une partie de l'ERAD en cas de besoin de dégradation des protéines synthétisées mal repliées.....	26
Figure 7 : Représentation schématique de la formation d'une vésicule COPII au niveau des ERES	28
Figure 8 : Représentation schématique de l'axe ER-ERGIC-Golgi par lequel le transport conventionnel des protéines se réalise.....	29
Figure 9 : Schéma représentant la fusion d'une vésicule à une membrane lipidique grâce à l'intervention de protéines des familles VAMPs et SNAREs.	30
Figure 10 : Schéma représentant les différentes modifications post-traductionnelles ayant lieu dans l'appareil de Golgi.	33
Figure 11 : Modèles hypothétiques de modes de sorties de l'appareil de Golgi.....	35
Figure 12 : Représentation tridimensionnelle et linéaire de la protéine chaperon Grp78.	37
Figure 13 : Schéma représentant les différentes voies de signalisation déclenchées par la localisation membranaire de Grp78.	39
Figure 14 : Schéma représentant la voie IRE1 et les effets de son activation.	40
Figure 15 : Représentation schématique de la structure primaire des effecteurs de l'UPR IRE1, PERK et ATF6 ainsi que leurs différents domaines.....	41
Figure 16 : Schéma représentant la voie PERK ainsi que les effets de son activation.....	43
Figure 17 : Schéma représentant l'activation de la voie ATF6	44
Figure 18 : Site de clivages des sérines protéase S1P et S2P, dans le cadre de la régulation des protéines SREBPs.	45

Figure 19 : Schéma récapitulatif de la mise en place de l'apoptose par l'intervention des voies IRE1 et PERK.	46
Figure 20 : Listes des rôles physiologiques et pathologiques de l'UPR dans l'organisme humain.	47
Figure 21 : Schéma représentatif des acteurs moléculaires impliqués dans la régulation de l'activation du complexe ULK1.	54
Figure 22 : Représentation schématique du processus d'élongation de la membrane d'un autophagosome au niveau du RE.	56
Figure 23 : Schéma représentant le trajet et les différents lieux d'origines des vésicules contenant ATG9 dans la cellule.	57
Figure 24 : Représentation schématique des processus d'activation des ATG8 et du complexe ATG12-ATG5-ATG16.....	59
Figure 25 : Schéma représentant l'action du complexe ESCRT-III lors de la fermeture de la membrane du phagophore	61
Figure 26 : Schéma représentant la fusion entre un autophagosome et un endosome tardif ou un lysosome, ainsi que les différents acteurs entrant en jeu dans ce phénomène	62
Figure 27 : Prévalence de la mucoviscidose en France selon le département de résidence	63
Figure 28 : Liste des quarante mutations les plus fréquemment retrouvées chez les patients français atteints de mucoviscidose.	64
Figure 29 : Schéma représentant les différentes classes de mutation et leurs effets sur la protéine CFTR.	66
Figure 30 : Représentation de la structure primaire et de la structure tridimensionnelle du canal CFTR.	67
Figure 31 : Schéma représentant la régulation de la sécrétion d'ions par les canaux CFTR et ENaC dans un cas physiologique sain ou dans un cas pathologique.	70
Figure 32 : Listes de famille de canaux régulés par le CFTR.	71
Figure 33 : Schéma représentant les différents types d'UPS existants.	74
Figure 34 : Représentation de l'impact systémique de la mucoviscidose sur l'organisme	76
Figure 35 : Tableau récapitulatif du nombre de décès de patients atteints de mucoviscidose en France entre 2012 et 2022.	78
Figure 36 : Principales molécules connues en utilisation ou avec des effets prometteurs pour le traitement de patients atteints de mucoviscidose.	81
Figure 37 : Formule topologique de la molécule PF-429242.....	85

Préambule

La mucoviscidose est la maladie génétique létale à transmission autosomique récessive la plus fréquente dans la population européenne. Cette maladie est due à des mutations altérant la séquence du gène *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR). La mutation la plus fréquente est une délétion d'une phénylalanine en position 508 de la séquence polypeptidique de la protéine CFTR, un canal permettant notamment le passage d'ions chlorure (Cl⁻). Les conséquences de cette mutation est la production d'une protéine altérée (p.Phe508del-CFTR) incapable de terminer ses étapes de maturation et d'atteindre la membrane plasmique. Cela a pour conséquence un épaississement du mucus recouvrant les voies respiratoires, digestives et génitales. Les organes concernés deviennent le terrain d'infections microbiennes, de réponses inflammatoires exacerbées et d'un stress cellulaire.

Ce stress est régulé par la réponse aux protéines mal formées (en anglais *unfolded protein response* : UPR), un mécanisme de défense cellulaire. Parmi les trois voies de signalisation régulant ce mécanisme, l'*activating transcription factor* (ATF) 6 est l'acteur central de ce projet de recherche. Nous montrons ici que son inhibition pourrait être une cible thérapeutique prometteuse dans le cadre de la mucoviscidose.

En effet, la mucoviscidose n'a toujours pas vu le développement de traitement curatif. Néanmoins, depuis vingt ans, de grandes avancées à ce sujet ont lieu et ont permis d'augmenter significativement la durée et la qualité de vie des patients. Cependant, les traitements actuels sont loin d'être parfait, car ils engendrent de nombreux effets secondaires et, surtout, tous les patients n'y sont pas éligibles. Il est donc essentiel aujourd'hui de développer de nouvelles pistes thérapeutiques, c'est dans ce cadre que se situe ce projet de recherche.

Afin de comprendre au mieux les différents mécanismes sous-jacents des bienfaits de l'inhibition d'ATF6 vis-à-vis de la mucoviscidose, ce manuscrit sera divisé en quatre parties. Nous commencerons par une mise en contexte avec le rôle du reticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil du Golgi dans la synthèse, la maturation et le transport des protéines. Nous verrons ensuite le rôle de l'UPR dans le maintien de l'homéostasie cellulaire globale. Nous nous pencherons sur le mécanisme d'autophagie, un processus cellulaire étroitement lié à l'UPR et à la mucoviscidose. Après avoir décrit ces processus de manière général, nous verrons le lien qu'ont entre eux ces divers mécanismes et comment ils s'inscrivent dans le contexte de la mucoviscidose.

Introduction

I. Synthèse et maturation des protéines

A. Généralités

La première description du RE remonte à plus d'un siècle, en 1898, par Charles Garnier. Alors interne des hôpitaux, il fait partie depuis trois ans d'un laboratoire à la faculté de médecine de Nancy sous la direction d'Auguste Prenant. Ce dernier a permis d'établir une base de connaissances conséquente dans les disciplines de l'histologie et de l'embryologie notamment en commençant à s'intéresser au contenu des cellules eucaryotes. A cette époque, le noyau était déjà une structure facilement observable grâce l'utilisation de colorations. L'existence du cytoplasme, alors appelé protoplasme, était déjà connu mais les moyens étaient insuffisants pour permettre une description et une étude précise de cette partie de la cellule. C'est dans le but d'explorer ce composant cellulaire que Charles Garnier est devenu le disciple d'Auguste Prenant.

Pendant la préparation de sa thèse de médecine, Charles Garnier parvient à observer au microscope optique une « forme filamenteuse » à proximité du noyau dans un modèle de cellules glandulaire grâce à des colorations basiques. Il décrit également les modifications de tailles de ces filaments, qui varient lors des phases de sécrétion glandulaire. Il appellera ce composé cellulaire « ergastoplasme », aujourd'hui connu sous le nom de RE. Plus tard, on a su que les colorations basiques utilisées ont rendu la détection possible grâce à la grande quantité d'ARN présente dans les ribosomes. Au final, dès 1898, Charles Garnier avait déjà commencé à poser les bases du schéma très connu : ADN, ARNm et synthèse de protéines.

Il faudra attendre presque 50 ans, dans les années 1940 et début des années 1950, pour que K. R. Porter, A. Claude, F. L. Kallman et E. F. Fullam permettent un bond de géant dans la description des organites cellulaires à l'aide de l'utilisation de la microscopie électronique (1–4). C'est à la suite de leurs travaux qu'on put être obtenues les premières photographies du RE à des résolutions encore jamais vues.

Depuis cette formidable avancée, l'étude de cet organite cellulaire et le développement des connaissances à son sujet n'ont cessé de croître. Nous savons que le RE est exclusif aux cellules eucaryotes, que sa structure est extrêmement labile et qu'il est constitué d'une multitude de réseaux membranaires en continuité avec la membrane du noyau cellulaire (5). Le RE constitue un point central de ce que l'on appelle le réseau endomembranaire des cellules eucaryotes.

Le RE peut être classé en deux types. D'un côté le RE dit « lisse » dont les rôles principaux sont la détoxification, le stockage de calcium et la synthèse de lipides (6). Le RE lisse possède des fonctions vitales pour l'organisme, mais nous nous focaliserons dans ce manuscrit que sur la description du RE dit « rugueux » ou « granuleux ». Il est appelé ainsi car il arbore à sa

membrane de petites entités que l'on appelle les ribosomes qui sont intrinsèquement liés à la fonction principale de ce RE rugueux : la synthèse des protéines. Par soucis de simplicité, le terme RE désignera dans la suite de ce manuscrit le type « rugueux/granuleux » de cet organe cellulaire.

B. Le réticulum endoplasmique granuleux

1. Biosynthèse des protéines

En collaboration avec d'autres chercheurs, G. Palade décrit pour la première fois la biosynthèse des protéines en réalisant une expérience de *pulse-chase* avec de la leucine radiomarquée (7). Cela lui a permis de suivre les protéines du début de leur traduction dans le RE jusqu'à leur sécrétion extracellulaire par exocytose, via des vésicules de transport, en passant par l'appareil de Golgi (8).

Nous savons aujourd'hui que ce sont les protéines membranaires, sécrétées ou lysosomales qui sont synthétisées dans le RE et cela représente un tiers de la totalité des protéines produites par la cellule (9).

Pour être produite, dans le cas d'une translocation dite co-traductionnelle, l'ARNm menant à la synthèse de la protéine va être pris en charge par le complexe ribosomale débutant ainsi la traduction dans le cytoplasme. Pour qu'une protéine soit synthétisée dans le RE, il faut qu'elle possède une séquence d'adressage du RE en position N-terminal de sa séquence polypeptidique, appelée peptide signal. Ce peptide signal est reconnu par un complexe protéique appelé la particule de reconnaissance du signal (en anglais *signal recognition particle* : SRP). Le complexe SRP se fixe au peptide signal de la protéine cible et la transporte jusqu'à la membrane du RE. La protéine se fixe et s'insère dans un pore de translocation, ou translocon, qui est appelé Sec61. Une fois dans le translocon, la protéine continue d'être synthétisée par le ribosome et continue sa translocation à travers Sec61. Le peptide signal est clivé par une enzyme nommée signal peptidase. Une fois cela fait, la protéine est libérée dans la lumière du RE et va pouvoir poursuivre son chemin jusqu'à son lieu de fonction. Ces étapes sont applicables dans le cas des protéines sécrétées, du RE, de l'appareil de golgi ou lysosomales (Figure 1) (10).

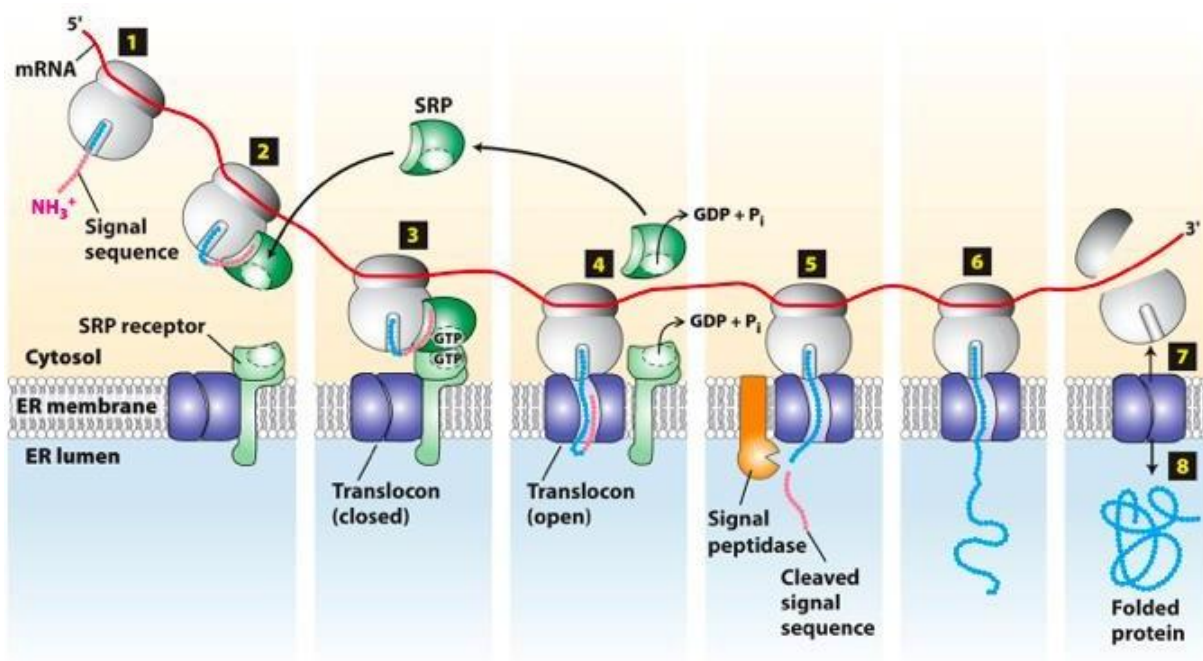


Figure 13-6
Molecular Cell Biology, Eighth Edition
© 2016 W. H. Freeman and Company

Figure 1 : Schéma représentant la translocation co-traductionnelle des protéines sécrétées. (Molecular Cell Biology, Eighth Edition, 2016)

La traduction de la protéine commence par la synthèse d'un peptide signal qui permet au complexe SRP de reconnaître la protéine afin de l'acheminer jusqu'au RE (1 et 2). Le complexe SRP va se lier à son récepteur, lui-même proche du translocon (3). Cette fixation va permettre de rapprocher la protéine du translocon où elle va pouvoir s'y insérer (4). Une fois entrée dans le translocon, le ribosome continue la traduction de la protéine en la libérant peu à peu dans la lumière du RE (6). En cours de route, le peptide signal est clivé par une signal peptidase (5). Une fois la traduction finie, la protéine est libérée dans le RE et commence son repliement (8). Le translocon se referme et le ribosome s'en détache (7).

Les protéines membranaires ont une traduction différente de ce qui a été décrit précédemment de par les propriétés hydrophobes de leurs domaines transmembranaires, qui leur permettent de s'insérer dans les membranes cellulaires. Il existe trois types de traduction chez les protéines membranaires déterminées par l'orientation de leurs extrémités N-terminale et C-terminale, et du nombre de domaine transmembranaire les composants.

Le premier cas est celui des protéines de type I, qui possèdent une extrémité N-terminale externe et une extrémité C-terminale cytosolique (Figure 2). Elles vont suivre les mêmes étapes que décrit précédemment à la différence qu'elles possèdent une séquence d'arrêt de transfert (SAT) qui va mener à l'arrêt de la translocation (11). Une fois la SAT traduite, un déplacement latéral va permettre sa sortie du translocon tout en restant ancrée de la membrane du RE. La SAT constitue ainsi le domaine transmembranaire de la protéine (12). Le ribosome qui se situe encore côté cytoplasme va continuer la traduction de la protéine, menant à la formation de l'extrémité C-terminale de cette dernière.

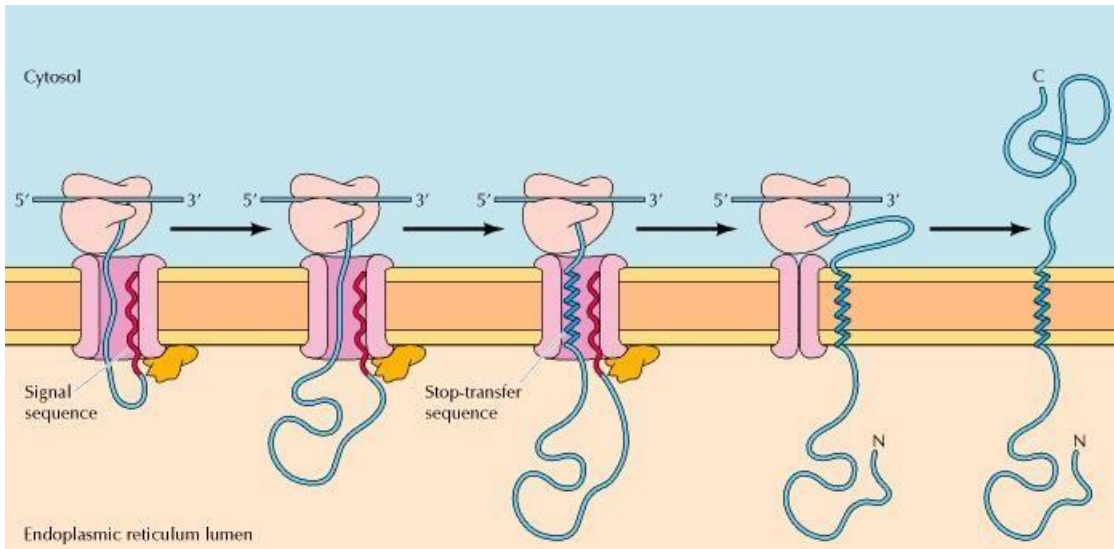


Figure 2 : Schéma représentant la translocation co-traductionnelle des protéines membranaires de type I. (The cell : A molecular Approach. 2nd edition)

Après son entrée dans le translocon, le peptide signal disposé en position N-terminale de la séquence polypeptidique est orienté de manière à faire en sorte que la partie traduite de la protéine reste dans la lumière du RE. Pour ce type de protéine, une séquence SAT va être traduite ce qui va permettre d'ancrer la protéine dans la membrane du RE dû aux propriétés hydrophobes de la SAT. Après un déplacement latéral permettant la sortie du translocon la traduction de la partie C-terminale reprend, dans le cytosol cette fois.

Le deuxième cas concerne les protéines de type II qui possèdent une extrémité N-terminale cytosolique et une extrémité C-terminale externe (Figure 3A). La différence de synthèse réside dans le positionnement du peptide signal. En effet ce dernier n'est pas situé en position N-terminale mais sera positionné au centre de la séquence polypeptidique ce qui amène à l'ancrage de la protéine dans la membrane du RE alors que l'extrémité N-terminale de la protéine est déjà traduite. Le peptide signal est orienté de manière à ce que l'extrémité N-terminale reste du côté du cytoplasme, permettant ainsi la synthèse de l'extrémité C-terminale. Le peptide signal n'est donc pas clivé mais devient un point d'ancrage de la protéine dans la membrane du RE.

Le troisième cas correspond aux protéines dites de type III (Figure 3B). Les étapes de traduction sont relativement similaires aux protéines de type II, la différence étant que leur extrémité N-terminale est luminale et que leur extrémité C-terminale est cytosolique. Le peptide signal sera donc orienté de façon à insérer la partie N-terminale dans un premier temps dans la lumière du RE. Tout comme les protéines de type II, le peptide signal sort du translocon par un déplacement latéral et le ribosome termine la traduction de l'extrémité C-terminale cytosolique.

Pour finir, il existe des protéines possédant plusieurs domaines transmembranaires. Ce sont les protéines de type IV qui sont séparées en deux sous-groupes : les protéines de type IV-A et IV-B. La différence entre les deux réside dans le positionnement des extrémités N-terminale et C-terminale. Les protéines de type IV-A ont leurs extrémité N-terminale et C-

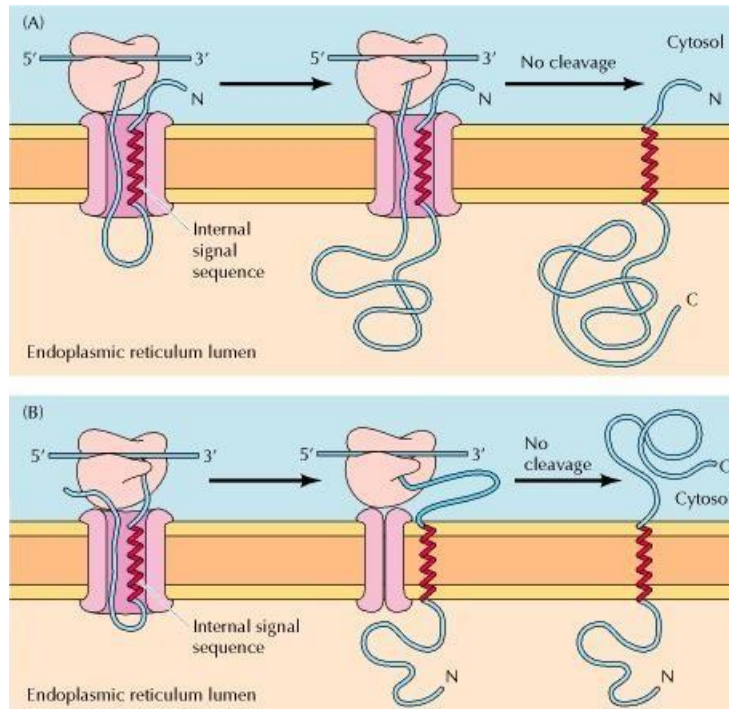


Figure 3 : Schéma représentant la translocation co-traductionnelle des protéines membranaires de type II (A) et de type III (B).
(The cell : A molecular Approach. 2nd edition)

(A) Pour ce type de protéine, le peptide signal est traduit plus tardivement et n'est donc pas situé à l'extrémité N-terminale de la protéine. Cela permet de l'orienter de manière à ce que l'extrémité N-terminale de la protéine se retrouve du côté cytosolique, permettant ainsi la traduction de la partie C-terminale de la protéine dans la lumière du RE. Le peptide signal n'est donc pas clivé, mais constitue un domaine transmembranaire une fois que le ribosome a fini la traduction de la partie C-terminale de la protéine.

(B) Pour les protéines de type III, la translocation co-traductionnelle est très similaire aux protéines de type II. La différence réside dans le sens d'orientation du peptide signal qui, ici, permet d'orienter la partie N-terminale de la protéine dans la lumière du RE.

terminale côté cytosolique, tandis que les protéines de type IV-B ont leur extrémité N-terminale du côté de la lumière du RE et leur extrémité C-terminale cytosolique. Concernant leur insertion co-traductionnelle le mécanisme sera le même utilisé que les deux cas précédents. Cependant, plusieurs SAT seront traduites au fur et à mesure du processus. Le peptide signal, en position N-terminale, s'ancre dans la membrane du RE et correspond au premier domaine transmembranaire. L'extrémité C-terminale continue d'être traduite par le ribosome jusqu'à la production d'une SAT, ce qui correspond au second domaine transmembranaire. Ces deux domaines sortent du translocon tandis que le ribosome continue la traduction produisant une alternance de peptide signal et de SAT qui s'ancrent à leur tour dans la membrane du RE. Ces étapes se renouvellent autant de fois que nécessaire jusqu'à l'apparition du codon stop mettant fin à la traduction de la protéine (Figure 4).

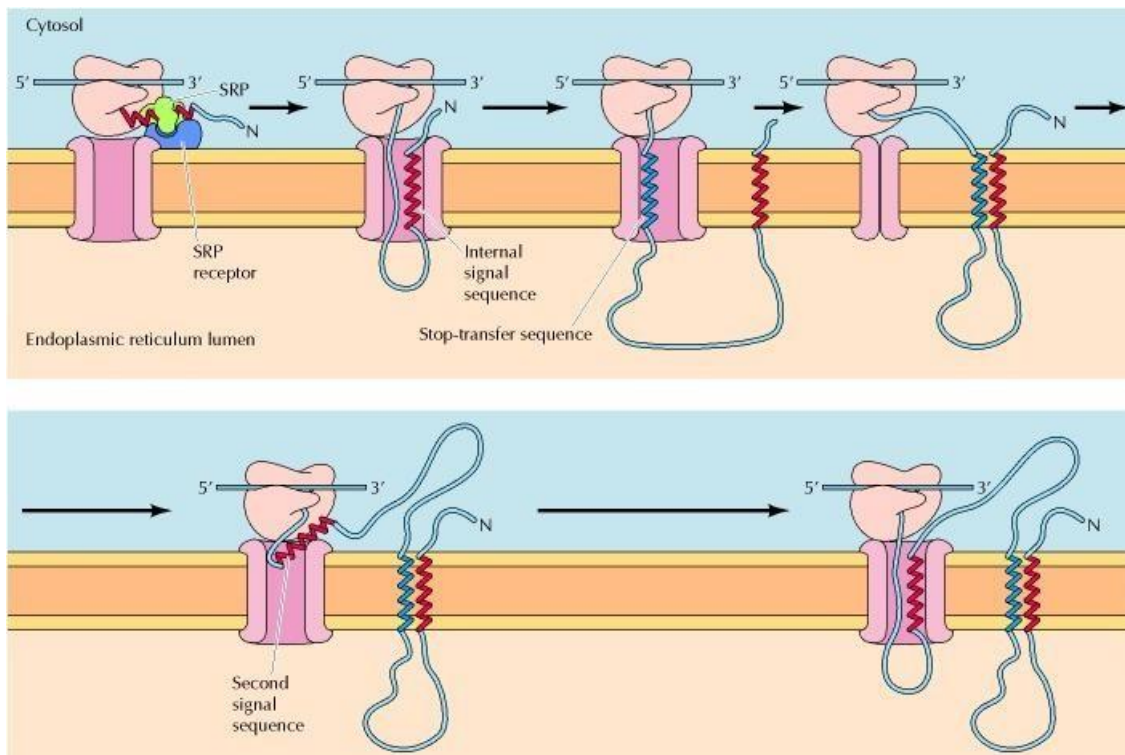


Figure 4 : Schéma représentant la translocation co-traductionnelle d'une protéine membranaire de type IV-A. (*The cell : A molecular Approach, 2nd edition*)

Les étapes de synthèse de ce type de protéine est relativement proche de celles observées pour les protéines de type II et III. Le ribosome commence sa traduction par un premier peptide signal qui va sortir du translocon par un mouvement latéral, donnant naissance au premier domaine transmembranaire. Le ribosome continue la synthèse de la protéine jusqu'à produire une SAT s'ancrant également dans la membrane, donnant lieu au deuxième domaine transmembranaire. Ces étapes se répètent autant de fois que nécessaire jusqu'à ce que la synthèse soit stoppée par la lecture d'un codon stop.

Une fois traduites, ces protéines vont pouvoir continuer leur chemin vers leur état final de maturation en subissant de multiples modifications. Cela va leur permettre d'obtenir une conformation tridimensionnelle viable, nécessaire pour mener à bien leur fonction dans la cellule. Cependant, pour cela, les protéines vont devoir valider différentes étapes de contrôle qualité.

2. Contrôle qualité lié au réticulum endoplasmique

a. Le repliement des protéines

Le repliement des protéines est un processus très complexe car à la frontière de nombreux domaines scientifiques, et possédant des parts d'ombre encore aujourd'hui. Ici nous ne décrivons pas en détails les étapes et les différents cas de repliement de protéine.

Le repliement protéique est une étape primordiale pour le devenir de la protéine, car c'est à ce moment qu'elle va pouvoir acquérir sa conformation tridimensionnelle conditionnant sa fonction dans la cellule. Son repliement est défini en premier lieu par la composition même en acide aminés de sa séquence polypeptidique. La charge, l'encombrement stérique et l'hydrophobicité des acides aminés sont les critères primordiaux à considérer lors du repliement de chaque protéine (13). En effet les acides aminés vont pouvoir alors rapidement interagir entre eux localement, menant à la formation d'hélices alpha ou de feuillets bêta. Ces structures sont dites secondaires et constituent une base solide pour la suite du repliement. Ces structures

secondaires vont ensuite pouvoir s'arranger entre elles dans l'espace, et l'interaction de ces différentes structures va former la structure finale de la protéine appelée structure tertiaire. A ce stade, le lien entre les différentes structures secondaires est maintenu par un grand nombre de liaisons faibles comme des liaisons hydrophobes, des liaisons de Van der Waals et parfois par des liaisons plus fortes comme des liaisons covalentes ou des ponts disulfures. Ainsi, la protéine a acquis à ce stade sa fonction à condition qu'il s'agisse d'une protéine monomérique. En effet, certaines protéines dites multimériques possèdent plusieurs sous-unités qui doivent s'arranger entre elles pour former une structure dite quaternaire, ce qui est une condition *sine qua non* pour que ce genre de protéine puisse mener à bien sa fonction.

La température et le pH sont également deux paramètres très importants dans ce processus. Ils peuvent, en effet, totalement modifier le repliement des protéines, formant ainsi des protéines dites « dénaturées » qui sont inactives sinon toxiques pour la cellule (14). Si tous les paramètres sont respectés, il y a deux possibilités de repliement envisageable : soit la protéine se replie une fois sa traduction terminée, soit elle se replie au fur et à mesure de sa traduction. Les protéines de petites tailles peuvent se replier spontanément dès lors que sa traduction est suffisamment avancée. D'autres protéines plus imposantes ont besoin d'intervenants extérieurs pour les aider dans ce processus. Ces intervenants sont appelés protéines chaperons qui, en plus d'aider au repliement de grosses protéines, peuvent guider les protéines mal conformées à retrouver leur conformation tridimensionnelle viable (15).

b. Les protéines chaperons

La fonction de ces protéines a été décrite pour la première fois par Laskey et al. en 1978 (16) et cette fonction protéique est une des dernières à avoir été recensée aujourd'hui (17). Initialement, cette découverte vient d'une erreur de manipulation faite en 1974, où des drosophiles ont été sujettes à des températures trop importantes pendant une expérience. L'équipe avait alors remarqué une expression anormale d'une famille de protéine qui a été nommée *Heat shock proteins* (Hsp) (18). Il en existe de plusieurs types telles que les Hsp90 ou Hsp70 nommées ainsi en fonction de leur poids moléculaire (90 kDa et 70 kDa respectivement). A l'origine, ces protéines ont été mises en évidence pour leur effet protecteur vis-à-vis d'autres protéines qui subissent une dénaturation liée à des variations thermiques intenses. Par la suite, il a été décrit que ces familles regroupent un grand nombre de protéines couvrant un large éventail de fonctions dans la cellule (19).

En plus de la température, le pH ou la présence d'agents chimiques peuvent également être des causes de la mise en place d'un stress cellulaire. C'est dans ces situations de stress que les protéines chaperons sont surexprimées. Ces protéines peuvent par exemple se fixer sur les résidus hydrophobes des protéines. Ces derniers peuvent en effet devenir problématiques dans des cas d'anomalies de repliement, car l'interaction de résidus hydrophobes entre différentes protéines peut former des agrégats délétères pour la cellule. Les chaperons synthétisés vont

alors se fixer à ces agrégats et tenter de les resolubiliser, aidant les protéines à masquer les zones hydrophobes du milieu aqueux (20–23).

En plus de leur rôle vital dans un contexte de stress, les protéines chaperons sont également nécessaires dans un contexte physiologique sain. Elles ont des fonctions très diverses en agissant seules ou à plusieurs. Elles peuvent être regroupées en trois grandes catégories qui participent à ce qu'on appelle d'une manière générale le système de contrôle qualité du RE.

La première catégorie regroupe les protéines chaperons intervenant dans l'aide au repliement des protéines. Les plus connues sont la *78kDa glucose-regulated protein* aussi connue comme *binding-immunoglobulin protein* (Grp78/BiP), que nous appellerons Grp78 par la suite, et la *94 kDa glucose-regulated protein* (Grp94). Ce type de chaperons intervient soit lorsqu'une protéine n'a pas réussi à acquérir sa conformation tridimensionnelle, soit parce que la protéine est trop imposante et a besoin de masquer ses résidus hydrophobes le temps que le reste de la protéine soit traduit (24). C'est à ce moment que des chaperons telles que Grp78 ou Grp94 interviennent en se fixant sur ces résidus hydrophobes. Une fois traduite, les caractéristiques chimiques des acides aminés composant la protéine vont faire en sorte de masquer les parties hydrophobes de la protéine lors de son repliement.

La deuxième catégorie concerne les protéines chaperons ayant la capacité à former des ponts disulfures permettant de maintenir la structure tertiaire d'une protéine à l'aide de ces liaisons très stables. Ces chaperons font parties de la famille des *protein disulfide-isomerase* (PDIs) (25). Les PDIs agissent dans un environnement oxydant pour permettre l'oxydation de deux cystéines proches. Cela permet la formation d'un pont disulfure qui peut être stable dans le temps ou temporaire.

La troisième et dernière catégorie regroupe des lectines agissant sur les protéines qui ont besoin d'être glycosylées pour finir leur maturation. Les deux lectines les plus connues sont la calnexine (CNX) ancrée dans la membrane du RE, et la calréticuline (CRT) qui est libre dans la lumière du RE. Le complexe CNX/CRT fait partie d'une des étapes de « checkpoints » qui permettent de contrôler le repliement d'une protéine glycosylée.

Dans le cas des protéines glycosylées, qui constituent la majorité des protéines synthétisées dans le RE, elles vont subir une suite de modifications post-traductionnelles, la première étant la N-glycosylation. Cette modification a lieu pendant ou directement après la traduction de la séquence polypeptidique et fait intervenir différentes enzymes dont l'oligosaccharyltransférase. Cette dernière permet l'ajout d'un oligosaccharide sur la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr, où X représente n'importe quel acide aminé excepté la proline. Ce glycan est composé de trois glucoses, neuf mannoses et deux N-acétylglucosamines ($\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$) (Figure 5). Il va, dans un premier temps, se voir supprimer les glucoses situés aux extrémités de la chaîne A par la glucosidase I puis la glucosidase II (N puis M respectivement). La chaîne devenue monoglycosylée ($\text{Glc}_1\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$) va être reconnue par le complexe CNX/CRT (26,27).

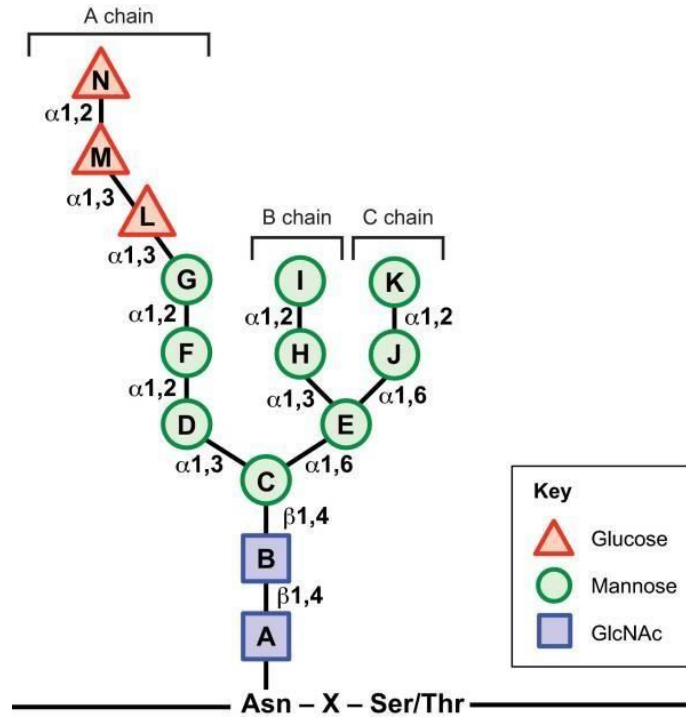


Figure 5 : Schéma représentatif de la cupule glucidique ajoutée pendant le processus de N-glycosylation sur un peptide en cours de synthèse dans le réticulum endoplasmique. (Ferris et al., 2014)

Cette interaction va permettre d'aider la protéine à se replier correctement grâce à l'intervention des PDI permettant la formation de ponts disulfures (28). La glucosidase II va ensuite cliver le dernier glucose (L) de la chaîne A. Si la protéine se replie correctement il y a l'intervention d'une dernière enzyme, l'*ER α 1,2-mannosidase I*, qui va cliver le mannose I de la chaîne B. Après quoi la protéine est exportée jusqu'à l'appareil de Golgi via les vésicules *coatomer protein II* (COPII), où elle pourra subir ses dernières étapes de maturation, dont la O-glycosylation, avant d'être transportée jusqu'à son lieu de fonction.

Dans le cas où la protéine n'arrive pas à acquérir sa conformation tridimensionnelle finale, elle va être reconnue par l'*UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase I* (UGT1). Cette enzyme peut reconnaître la chaîne $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ ou les résidus hydrophobes des protéines mal repliées. UGT1 permet l'ajout d'un glucose (correspondant au glucose L de la figure 5) et donc à la protéine d'être à nouveau reconnue par le complexe CNX/CRT. Si cette étape d'aide au repliement ne fonctionne pas une seconde fois elle se répète à nouveau. Si au bout de quelques cycles la protéine n'a toujours pas réussi à se replier correctement, l'intervention de l'*ER α 1,2-mannosidase I* ou de l'*ER-degradation enhancing α -mannosidase-like protein 2* (EDEM2) initiera le retrait du mannose I de la chaîne B (Figure 5) (29–31). Un oligosaccharide composé de $\text{Man}_8\text{-GlcNAc}_2$ est ainsi obtenu. Ce glycan n'est ni reconnu par le complexe CNX/CRT ni par l'UGT1. La protéine est alors prise en charge par des protéines liées au processus de dégradation lié au RE (32).

3. Description succincte du système de dégradation des protéines, lié au réticulum endoplasmique

Ce processus de dégradation lié au RE est un processus encore mal compris à ce jour. Nous considérerons uniquement le cas des protéines glycosylées, car celui des protéines non glycosylées n'a pas été étudié dans ce projet de recherche.

Le processus de dégradation des protéines lié au RE (en anglais *endoplasmic reticulum-associated degradation* : ERAD) peut être divisé en quatre étapes : la reconnaissance de la protéine à dégrader, la sortie des protéines du RE avec, de manière concomitante, leur ubiquitinylation et leur acheminement vers le protéasome 26S où elles sont dégradées.

La première étape est initiée par la modification de l'oligosaccharide ornant la protéine à dégrader. Comme mentionné plus haut, dans le cas où les différentes étapes d'aide au repliement sont insuffisantes, l'*ER α1,2-mannosidase 1* ou EDEM2 entrent en jeu. Ces enzymes vont retirer un mannose de la chaîne oligosaccharidique composée alors de $\text{Man}_8\text{-GlcNAc}_2$ (30,31). La modification du motif glucidique lié à la protéine a pour conséquence de la rendre méconnaissable à la reconnaissance du complexe CRT/CNX ou par l'UGT1. EDEM1 et EDEM3 suppriment le mannose K de la chaîne C (33,34), permettant aux lectines *osteosarcoma 9* et *XTP3-transactivated gene B protein* de reconnaître et de prendre en charge la protéine glycosylée (35,36). Cela va mener au transport de la protéine jusqu'au pore de rétrotranslocation qui va permettre sa sortie du RE, correspondant à la deuxième étape de l'ERAD (Figure 6) (37). Pendant leur transport vers ce pore de rétrotranslocation, les protéines mal repliées vont être relinéarisées via l'intervention de protéines chaperons comme Grp78, Grp94 ou encore par l'intervention de PDIs (38,39).

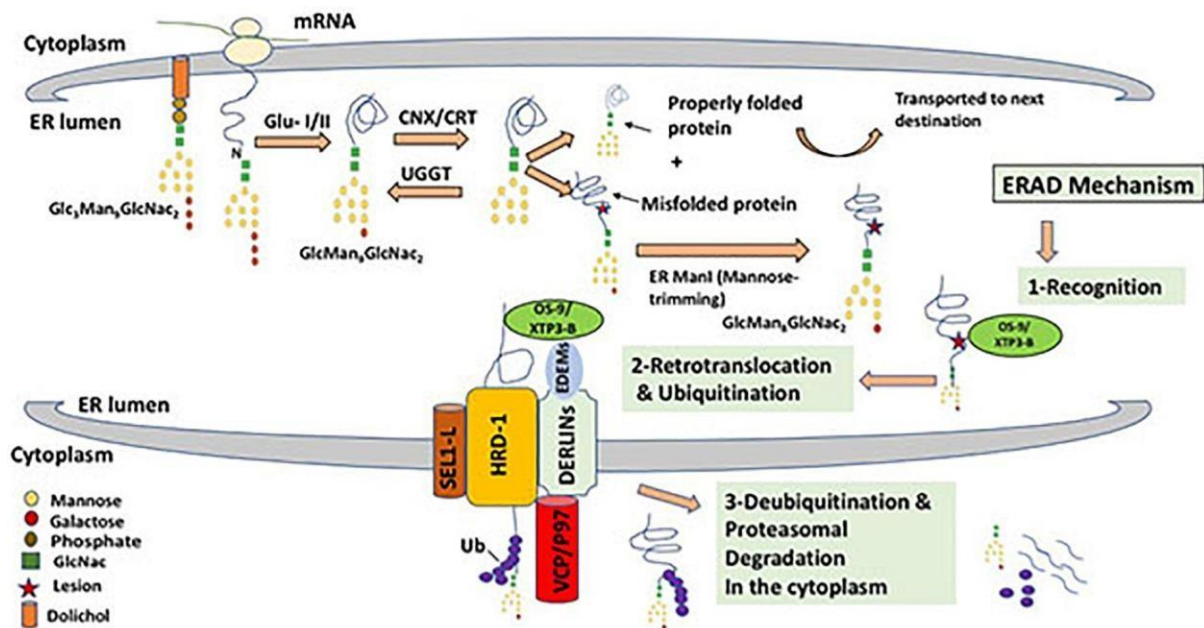


Figure 6 : Schéma représentant les différentes étapes du contrôle qualité du RE et d'une partie de l'ERAD en cas de besoin de dégradation des protéines synthétisées mal repliées. (N. Gariballa and B. R. Ali, 2020)

Sans pour autant établir une liste exhaustive de tous les acteurs impliqués dans le transport des protéines glycosylées à dégrader vers le cytosol, nous pouvons citer les *Derlin1/2/3*, *Valosin-containing protein* (VCP) (ou p97 ATPase), *VCP-interacting membrane protein* (VIMP) (aussi appelée *Selenoprotein S*) et *suppressor of lin-12-like protein 1* (SEL1L) (40–42). Les Derlins et SEL1L font parties du complexe de translocation et permettent de fixer les protéines à faire passer à travers ce pore. VCP serait impliquée dans l'ubiquitinylation et la translocation des protéines de manière *Adenosine triphosphate* (ATP)-dépendante (43–45). Enfin, VIMP pourrait servir de pont entre tous ces acteurs et les protéines à dégrader (46).

Beaucoup de protéines semblent être impliquées dans l'ubiquitinylation des protéines lors de leur sortie du RE et semblent agir sur les protéines à différentes étapes de maturation. Les enzymes permettant l'ubiquitinylation de protéines à dégrader varient en fonction de la cible, mais un même schéma en trois étapes est suivi dans tous les cas. Le premier groupe d'enzyme nommé *ubiquitin-activating enzymes E1* permet d'initier le processus. Le deuxième groupe appelé *ubiquitin-conjugating enzymes E2* sert à transférer la cible vers le dernier groupe, les *E3 ubiquitin ligase*, lequel permet de finaliser l'ubiquitinylation de la cible (47).

Par exemple, dans le cas du p.Phe508del-CFTR, l'enzyme E1 UBA1 permet de débiter le processus d'ubiquitinylation (47) et l'enzyme de conjugaison E2 UbcH5b permet de transférer le p.Phe508del-CFTR vers les enzymes E3 (48). Parmi ces E3 ubiquitine-ligase liées à la dégradation du CFTR nous pouvons citer *RING finger protein 5* ou *RING-type E3 ubiquitin transferase CHIP*, qui sont impliquées dans son transport vers l'ERAD de manière co-traductionnelle ou de manière post-traductionnelle respectivement (46,47,49). Quoi qu'il en soit, une autre protéine centrale dans ce mécanisme nommée *HMG-CoA reductase degradation*, une ubiquitine ligase E3, est liée aux Derlin2/3 (50) et permet avec SEL1L de réguler le passage des protéines du RE vers le cytosol (51,52). Les protéines polyubiquitinylées vont ensuite être transportées jusqu'au protéasome 26S pour y être dégradées.

C. Transport conventionnel des protéines

1. La sortie du réticulum endoplasmique

Pour les protéines n'étant pas résidentes du RE, leur transport jusqu'à leur lieu de fonction dans la cellule peut se réaliser une fois qu'elles ont adopté une structure tridimensionnelle viable. Le mécanisme régissant cela est le transport conventionnel des protéines, et est médié par les vésicules COPII. C'est un mécanisme existant chez les levures et a été très conservé durant l'évolution, il est donc retrouvé également chez les eucaryotes avec les mêmes intervenants moléculaires (53). La plupart de ces intervenants font partie de la famille des protéines Secs (53,54). Les vésicules COPII sont formées au niveau des sites de sortie du RE, ou ER exit sites (ERES) en anglais (55).

Le processus débute avec le recrutement au niveau de la membrane du RE d'une enzyme cytosolique permettant l'hydrolyse de *guanosine triphosphate* (GTP) (GTPase) nommée

secretion-associated RAS-related 1 (Sar1). Sar1 est activée par Sec12 qui permet de catalyser l'échange d'une molécule de GDP et de GTP (56). Cette activation va permettre l'ancrage de Sar1 dans la membrane du RE par sa partie N-terminale permettant le recrutement de l'hétérodimère Sec23/Sec24 (57). Cela engendre le début de la formation de la vésicule en faisant courber la membrane du RE (58). L'hétérotétramère Sec13/Sec31 vient ensuite se fixer sur le complexe Sar1/Sec23/Sec24 et forme ainsi la couche externe de la vésicule COPII (59,60). Parmi ces acteurs, Sec24 permet la fixation des protéines cargo qui seront à transporter par ce mécanisme (61). Par ailleurs, Sec23 possède une activité GTPase en se fixant sur Sar1 qui permet à la vésicule COPII de se détacher de la membrane du RE (Figure 7).

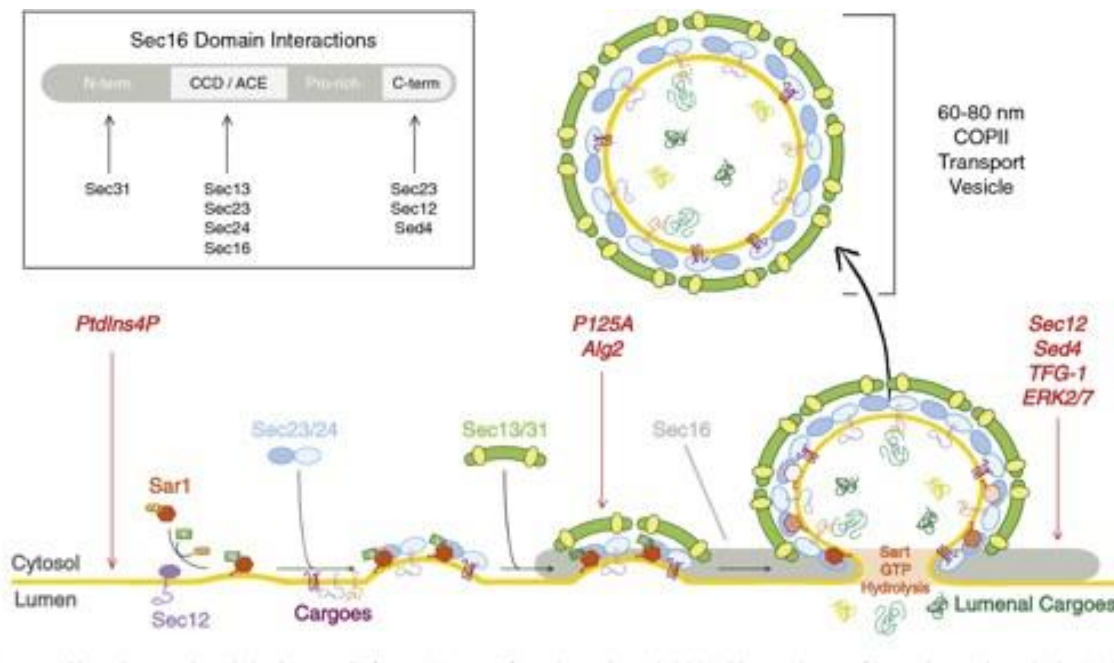


Figure 7 : Représentation schématique de la formation d'une vésicule COPII au niveau des ERES. (J. G. d'Arcangelo et al., 2013)

Sar1 est activée par Sec12 ce qui permet l'ancrage de Sar1 dans la membrane du RE. La membrane commence à se courber grâce au recrutement de l'hétérodimère Sec23/Sec24. La couche externe de la vésicule se forme grâce à l'ajout de l'hétérotétramère Sec13/Sec31. Sec16 permet de retarder le bourgeonnement de la vésicule COPII le temps que les protéines cargo soit recrutées sur ce site via leur fixation sur Sec24.

Il existe des moyens de régulation pour que ce processus se déroule au bon moment, et ainsi éviter un désassemblage précoce de la vésicule COPII avant la fin de sa formation. C'est ici qu'intervient Sec16, un dernier acteur important de la formation de ces vésicules de transport. Sec16 est une protéine possédant à ce jour deux isoformes connus qui sont Sec16a et Sec16b. Les fonctions exactes de ces deux molécules ne sont pas encore tout à fait comprises, mais nous verrons un peu plus loin que Sec16a possède divers rôles qui commencent à être de plus en plus décrit. Si nous revenons à la formation de nos vésicules COPII, Sec16 interagit avec un grand nombre de composants de ces structures. Plus précisément, elle agirait en limitant l'interaction entre Sec31 et Sec23 (62,63). Cela limite alors l'activité GTPase de Sec23 sur Sar1, et retarde le « bourgeonnement » de la vésicule COPII, en attendant qu'elle soit entièrement formée. Cela permet de rendre la vésicule suffisamment stable pour transporter les protéines cargo en son sein jusqu'à l'appareil de Golgi.

2. Le transport jusqu'à l'appareil de Golgi

Dans les cellules eucaryotes animales, le transport des protéines néosynthétisées n'est pas direct vers l'appareil de Golgi. Les vésicules de transport COPII contenant les protéines cargo passent tout d'abord dans un compartiment intermédiaire : l'*ER-Golgi-intermediate compartment* (ERGIC) (Figure 8). Même si les premières études sur ce transport datent d'il y a

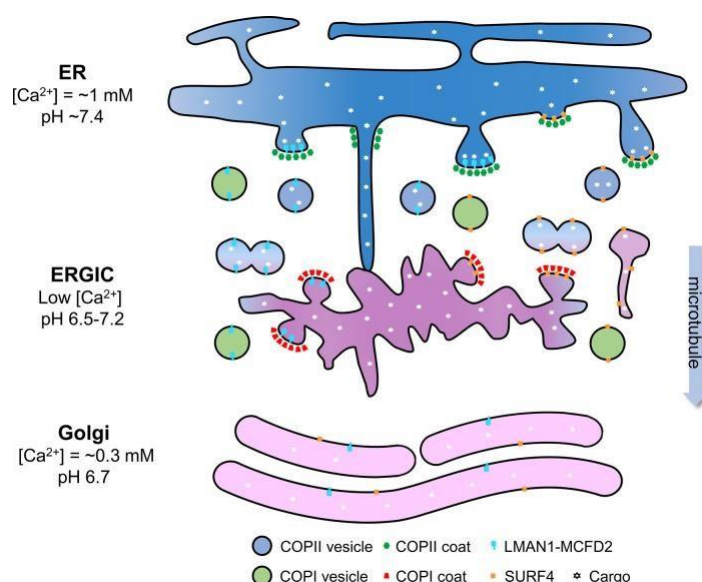


Figure 8 : Représentation schématique de l'axe ER-ERGIC-Golgi par lequel le transport conventionnel des protéines se réalise. (Zhang et al. 2023)

plus de 20 ans, les mécanismes moléculaires liés à ce transport dit antérograde restent encore flous. Il semble y avoir deux types de mécanismes qui relient les ERES au ERGIC. Etant de nature très labile, les ERES seraient capables de créer des formes tubulaires qui connecteraient directement les deux organites (64–66). Le deuxième processus se déroulerait par la formation de vésicules de transport, impliquant l'intervention de *Rab GTPase* (Rab1), des protéines de la famille des *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors* (SNAREs) et les *Vesicle-associated membrane proteins* (VAMPs) (67–71). Ces VAMPs à la surface des vésicules COPII vont s'associer avec les SNAREs qui sont présents à la membrane d'arrivée. L'association de ces deux types de protéines va créer un phénomène de torsion forçant ainsi la fusion des deux membranes lipidiques (Figure 9) (72–74).

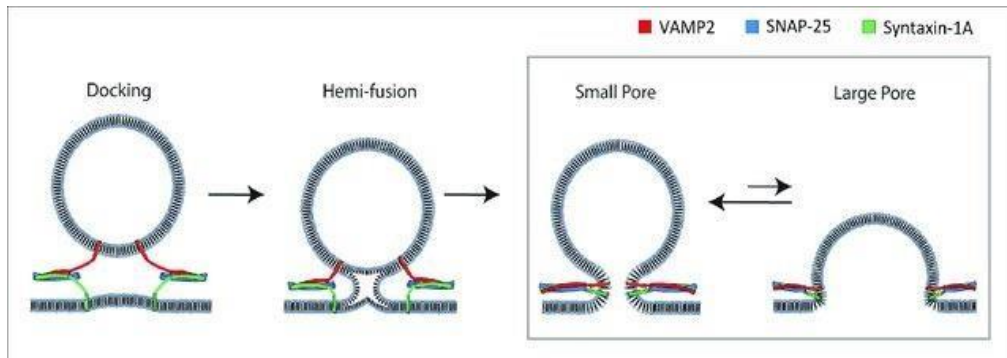


Figure 9 : Schéma représentant la fusion d'une vésicule à une membrane lipidique grâce à l'intervention de protéines des familles VAMPs et SNAREs. (Khounlo et al., 2021)

Après leur arrivée dans le ERGIC, les protéines des COP-II sont ramenées vers le RE par le mécanisme de transport dit rétrograde. Ces protéines sont prises en charge par un autre type de vésicules de transport appelées les *coatamer protein I* (COP-I). Ces vésicules COP-I sont composées de sept sous-unités : α , β , β' , γ , δ , ϵ , ζ qui forment un complexe où γ -COP, δ -COP, ζ -COP et β -COP constituent la face interne des vésicules. Alors que α -COP, β' -COP et ϵ -COP constituent la face externe (75–77). Ces sous-unités sont recrutées à la membrane de l'appareil de Golgi par la GTPase *Adenosine diphosphate (ADP)-ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor 1* (Arf1). L'assemblage des sous-unités permet la formation des vésicules COP-I qui migrent ensuite le long des microtubules pour atteindre l'ERGIC, permettant la mise en place du transport rétrograde. Les protéines en cours de maturation arrivées à ce stade continuent pendant ce temps leur chemin le long de l'appareil de Golgi.

3. L'appareil de Golgi

a. Généralités

L'appareil de Golgi est un organite faisant partie intégrante du système endomembranaire et est divisé en trois parties : le cis-Golgi, le golgi médian et le trans-Golgi où les protéines vont subir des étapes de maturation tout le long de leur passage dans cet organite (78). Ces différentes parties forment ce qu'on appelle les saccules golgiens qui sont un enchaînement de compartiments très labiles interagissant entre eux. De par les échanges réguliers entre les différents compartiments, beaucoup de protéines semblent être impliquées dans la structure de ces saccules. Néanmoins, au moins d'un point de vue historique, les deux protéines phares du maintien structural de l'appareil de Golgi sont les *Golgi reassembly-stacking proteins* (GRASPs). Il en existe deux : GRASP55 et GRASP65, nommées ainsi en fonction de leur poids moléculaire de 55 kDa et 65 kDa, respectivement. En formant des oligomères, GRASP65 permet la formation du cis-Golgi et GRASP55 permet quant à lui la formation du Golgi médian et du trans-Golgi (79).

Il est admis que les vésicules COPI permettent de transporter les protéines nouvellement arrivées via les vésicules COPII dans le ERGIC vers l'appareil de Golgi. Le mécanisme de

transport des protéines au sein même de l'appareil de Golgi reste encore aujourd'hui sujet à discussion.

Un premier modèle dit que les vésicules COP-I permettent le transport des protéines cargo en suivant dans l'ordre les différents compartiments golgiens. Les compartiments sont donc déjà formés, accueillant les protéines cargo afin de leur apporter les dernières modifications post-traductionnelles qu'elles doivent subir grâce aux enzymes propres à chaque compartiment.

Un deuxième modèle plus récent propose un appareil de Golgi plus labile. En effet, les protéines cargo migreraient du ERGIC via un regroupement des différentes vésicules de transport formant ainsi dans un premier temps le cis-Golgi. Puis ce dernier maturerait et continuerait à avancer au sein de la cellule, formant le Golgi médian. Enfin, il terminerait sa maturation pour donner le dernier compartiment qui est le trans-Golgi. Les protéines ainsi transportées via ce modèle seraient modifiées au fur et à mesure du changement de composition enzymatique du compartiment golgien qui les accueille.

Ce dernier modèle semble être plus admis par la communauté scientifique au cours de ces dernières années. Dans les deux cas le flux rétrograde a lieu. Ce dernier permet de recycler les protéines impliquées dans les divers processus de maturations et de transport des protéines cités précédemment (80–83).

b. Les modifications post-traductionnelles

L'appareil de Golgi est le dernier des compartiments où les protéines vont subir des modifications post-traductionnelles avant d'être transportées vers leur lieu de fonction. Il y a sept modifications possibles dans ce compartiment : la glycosylation faisant suite ou non à celles effectuées dans le RE, l'acétylation, la sulfatation, la phosphorylation, la méthylation, la palmytation ou encore le clivage de précurseurs protéiques permettant leur activation (Figure 10).

Pour la glycosylation, l'ajout de chaînes glucidiques ayant eu lieu dans le RE peut se terminer dans l'appareil de Golgi. Il existe seize voies différentes de glycosylation dont quatorze pour les protéines (N-glycosylation, O-glycosylation pour les protéines de types mucines, synthèse de glycosaminoglycanes, ...) et deux pour les lipides (biosynthèse de glycosphingolipides par exemple) (84). Le phénomène de glycosylation est un élément central qui va régir les capacités d'interaction protéine/protéine, protéine/molécule ou encore l'association des protéines avec les rafts lipidiques. Tout cela va conditionner l'activité d'une protéine une fois arrivée à son lieu de fonction mais aussi la durée de sa demi-vie.

L'acétylation consiste à retirer un atome d'hydrogène pour le remplacer par un groupe fonctionnel d'acétyle COCH_3 , via l'intervention d'une molécule donneuse acétyle coenzyme A. Il existe deux grands types d'acétylation possible : l'acétylation en N-terminale de la

protéine (concernant notamment les histones, modifiant ainsi leur affinité pour l'ADN) ou l'acétylation se produisant sur des monosaccharides (85,86).

La sulfatation permet l'ajout d'un sulfate sur le groupe hydroxyle d'une tyrosine présente sur une protéine, ou sur une chaîne glucidique. Cette réaction est catalysée de manière ATP-dépendante par une sulfotransférase permettant le transfert du sulfate vers l'accepteur via une molécule de 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate qui fait office de donneur (87–89).

La phosphorylation est un processus très important pour divers mécanismes cellulaires et réversible. Elle consiste en l'ajout d'un groupement phosphate (PO_4^{3-}) sur tout type de molécule facilitant la reconnaissance d'une protéine pour qu'elle puisse être transportée à son lieu de fonction, comme dans le cas des protéines lysosomales. Cela peut également permettre l'activation de diverses kinases, d'enzymes ou de récepteurs, et donc le déclenchement de voies de signalisation moléculaire (90).

La méthylation consiste à ajouter un groupement méthyl à une molécule. Dans le cas des protéines, la méthylation se réalise sur une lysine et n'est pas un processus exclusif à l'appareil de Golgi. Cependant, dans le cas de cet organite, cette modification post-traductionnelle s'effectue du côté cytosolique de l'appareil de Golgi en faisant intervenir la *S-adenosylmethionine* (91).

La palmytylation est l'ajout d'un acide gras à une résidu cystéine d'une protéine. Cette réaction réversible est catalysée par une palmytyl acyltransférase. L'ajout d'un telle chaîne lipidique permet d'augmenter l'hydrophobicité d'une protéine, et donc de permettre son ancrage dans une membrane ou d'aider à l'association de deux protéines entre elles (92).

Enfin, le clivage de précurseurs protéique permet de rendre actif une protéine dans le but d'acquérir sa fonction. Beaucoup de protéines demandent de tels effets notamment des facteurs de croissance, des récepteurs de la membrane plasmique, des canaux ioniques tels que le canal sodique épithélial (*epithelial sodium channel* en anglais : ENaC) (93) ou encore des facteurs de transcription. Parmi ces derniers, est représenté sur la figure 10 le *Sterol regulatory element-binding protein* (SREBP) qui se fait cliver successivement par deux sérines protéase : la *Site-1 Protease* (S1P) puis la *Site-2 protease* (S2P) (94). Nous reviendrons plus loin sur ce mécanisme car, même si nous n'allons pas décrire précisément les effets des SREBPs dans ce manuscrit, ATF6 est un autre facteur de transcription central dans ce projet qui est activé de cette manière.

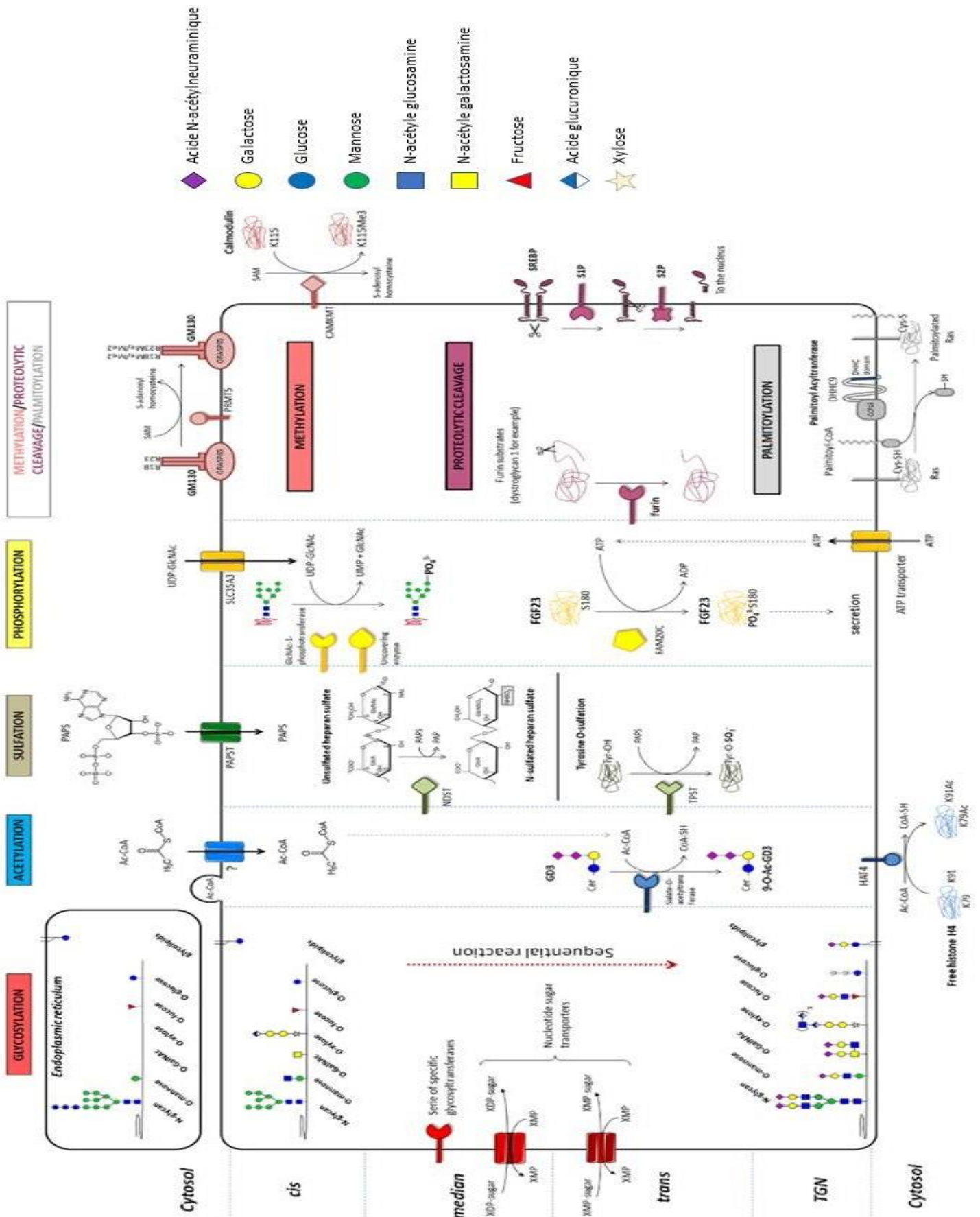


Figure 10 : Schéma représentant les différentes modifications post-traductionnelles ayant lieu dans l'appareil de Golgi. (Modifiée de Potelle et al., 2015)

c. *Les mécanismes de transport à la sortie de l'appareil de Golgi*

Historiquement, il était pensé que la sortie des protéines de l'appareil de Golgi se faisait de manière constitutive, sans régulation. Il s'avère que ce processus est plus complexe que cela et que de nombreux acteurs entrent en jeu pour déclencher, aiguiller et acheminer les protéines vers la bonne voie de transport. Si nous mettons de côté les types de transport rétrograde de protéines permettant le retour des protéines originaires du RE vers cet organite (95) ou le maintien des protéines golgiennes dans l'appareil de Golgi (96), il existe deux grands types de transport permettant la sortie des protéines cargo de l'appareil de Golgi.

Le premier concerne les protéines à destination du système endolysosomal. Cela englobe le transport d'hydrolases lysosomales ou de leur récepteur, via des vésicules qui peuvent être recouvertes de protéines de structure appelées clathrines, elles-mêmes connues pour être impliquées dans le phénomène d'endocytose. Un récepteur, le *mannose-6-phosphate receptor* (M6PR), semble être un des acteurs prépondérants de cette voie. En effet, le M6PR reconnaît les sucres présents sur les protéines acquis lors de leur dernière étape de maturation dans l'appareil de Golgi, dans le but d'initier le transport en direction du système lysosomal des protéines concernées (97). Il n'est cependant pas le seul décrit à avoir ce rôle car, plus récemment, d'autres acteurs moléculaires ont été décrits. Nous pouvons citer la *sortilin* impliquée dans le transport de protéases lysosomales telles que les cathepsine D et H en association avec le M6PR (98,99). Nous pouvons également citer la *lysosomal integral membrane protein 2* qui fait partie d'une voie alternative dont le dysfonctionnement est relié à la maladie de Gaucher (100).

Le deuxième type de transport est celui permettant le transport des protéines directement jusqu'à la membrane plasmique. Malgré des dizaines d'années de recherche, aucune description des voies régulant ce mécanisme ne fait consensus. Ce processus semble très complexe, car les différents types de transport du *trans-golgi* vers la membrane plasmique pourraient être dépendant du type de protéine cargo à transporter. De plus, il se pourrait que les voies empruntées divergent en fonction du type cellulaire, notamment pour les cellules épithéliales qui semblent avoir un moyen de discriminer quelles protéines sont à transporter à leur pôle apical ou à leur pôle basolatéral (101). Pour expliquer le transport des protéines de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique, il existe à ce jour six acteurs qui semblent être centraux dans ce mécanisme (Figure 11) (101).

Les modèles Arf1, *Lysosome-associated membrane glycoprotein* (LAMP) 1 et *Ras-related protein* (Rab) 6 ont été séparés sur la figure 11 mais sont très similaires. Il est même fortement probable qu'ils constituent un seul et même mécanisme. Arf1, connu pour son rôle dans la biogénèse des vésicules COP-I, permet de courber la membrane et initier la formation d'une structure lipidique. Rab6 est une protéine importante pour la mobilité des transporteurs au sein de la cellule. Le cas de LAMP-1 est plus complexe car cette protéine a été retrouvée dans des

formations tubulaires faisant le lien entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique, mais son rôle exact est inconnu.

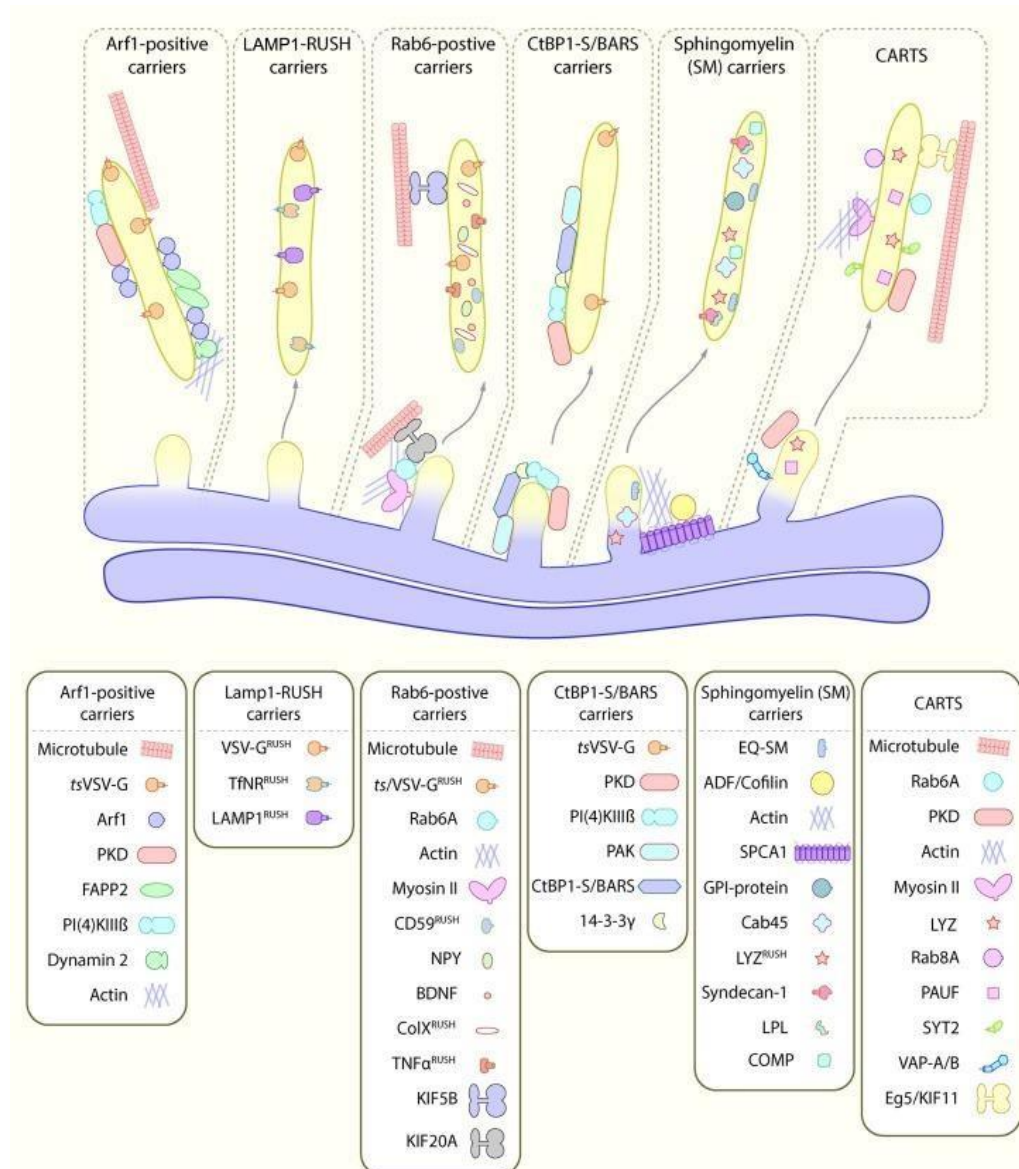


Figure 11 : Modèles hypothétiques de modes de sorties de l'appareil de Golgi. (D. Stalder and D. C. Gershlick, 2020) Les différents acteurs présentés ici ont été séparé pour plus de clarté et parce qu'ils ont été mis en évidence dans des contextes de recherches différents. Cependant, il est fortement supposé que Arf1, LAMP-1, Rab6 puissent être regroupé au sein du même modèle. De même pour les CARTS qui possèdent des acteurs communs avec les transporteurs à la sphingomyéline. Enfin, il est même possible que tous ces mécanismes ne soient en réalité qu'un seul et unique. En effet, la protéine CtBP1-S/BARS semble constitutives de l'appareil de Golgi, donc elle pourrait très bien trouver un rôle dans chaque modèle.

Les CARTS sont des types de transporteurs différents des vésicules COP-I et COP-II. Ils utilisent divers Rabs (dont Rab6) afin de se mouvoir le long des microtubules et d'atteindre la membrane plasmique. Le modèle des CARTS a des acteurs en commun avec celui décrivant l'implication des sphingomyélines, et sont tous deux calcium-dépendants. Il est donc suspecté que ces deux hypothèses puissent en réalité n'être qu'un seul et unique modèle.

Enfin, la CtBP1/BARS a été mis en évidence comme étant vital dans le maintien structural de l'appareil de Golgi. Cependant il a également été montré que, par leur activité de

lysophosphatidic acid acyltransferase, cette protéine augmentait le nombre de transporteur sortant du Golgi d'une manière générale.

Peu d'informations permettent, à ce jour, de confirmer ces hypothèses. Il est cependant très fortement supposé que ces modèles pourraient travailler en parallèle en fonction du cargo à transporter. La possibilité que ces différents modèles fassent partie d'un seul et même mécanisme n'est également pas à exclure (101).

II. La réponse aux protéines mal formées

Découvert en 1988, l'UPR est une réponse physiologique normale au sein des cellules eucaryotes nécessaire à leur bon fonctionnement (102). C'est un mécanisme de défense permettant aux cellules de maintenir l'homéostasie générale du RE à un état physiologiquement normal.

A. Principales fonctions et facteurs d'induction de la réponse aux protéines mal formées

Le RE peut subir un stress qui peut se prolonger dans le temps ce qui va amener à déclencher la réponse UPR, afin de rétablir un état physiologiquement normal. Ce stress peut être dû à plusieurs facteurs tels que la privation de glucose, l'hypoxie, la dérégulation du stockage des ions calcium, la présence d'espèces réactives à l'oxygène, la présence de métaboliques toxiques ou la mise en place de réponses inflammatoire ou infectieuse (103). Dans certaines maladies, comme le cas de la mucoviscidose que nous développerons plus loin, l'UPR peut être déclenchée par une réponse inflammatoire et/ou infectieuse importante (104). De plus, bien que cela ne fasse pas consensus, l'accumulation de protéines mal formées dans la lumière du RE pourrait jouer un rôle dans le déclenchement de ce mécanisme (105).

En recherche, des composés chimiques sont utilisés pour leur capacité à induire l'UPR. Parmi les plus connues, le dithiothreitol amène à la dénaturation des protéines par la réduction des pont-disulfures permettant le maintien de leur structure tridimensionnelle (106). La tunicamycine a un effet inhibiteur sur la N-glycosylation des protéines (106). Et enfin, la thapsigargine agit comme une molécule inhibitrice de la pompe à calcium *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase SERCA*, amenant à une déplétion du calcium présent dans la lumière du RE (107).

Les principales fonctions de l'UPR consistent dans un premier temps à réduire la synthèse globale des protéines dans le but de diminuer la quantité de protéines dans la lumière du RE (9). La synthèse de protéine chaperons est augmentée afin d'aider les protéines mal repliées à prendre leur structure tridimensionnelle. Des protéines régissant la mise en place de l'ERAD sont également produites afin de dégrader les protéines qui ne parviennent pas à atteindre leur conformation finale, et cela malgré l'intervention des nombreuses protéines

chaperons (108–110). Si tout cela ne suffit à rétablir l'homéostasie globale, l'UPR va alors déclencher l'apoptose (111,112).

De tels phénomènes amènent un déséquilibre dans l'homéostasie générale de la cellule. Cela va modifier grandement le fonctionnement global et peut avoir des conséquences délétères sur la survie cellulaire. Pour réguler tout cela, l'UPR est modulée par trois voies de signalisation interconnectées : ATF6 que nous avons déjà mentionné précédemment (113,114), *Inositol-Requiring Enzyme 1* (IRE1) (115) et *Protein Kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase* (PERK) (116). A un état basal, ces acteurs moléculaires sont ancrés dans la membrane du RE et sont associés à la protéine chaperon Grp78.

B. Acteurs moléculaires principaux

1. Grp78

a. Structure

Grp78 est une protéine chaperon de la famille des Hsp70 (117). Cette protéine résidente du RE est codée par le gène *HSPA5* et est présente chez tous les organismes eucaryotes. Elle est composée de deux domaines principaux : le *nucleotide binding domain* (NBD) en N-terminale et le *Substrate Binding domain* (SBD) en C-terminal (Figure 12). Le domaine NBD est un domaine permettant la fixation et l'hydrolyse d'ATP en ADP tandis que le SBD permet la fixation du substrat à Grp78 (118,119). La régulation d'une telle fixation est liée à l'état de fermeture/ouverture du domaine NBD, cela étant lié directement à l'état d'hydrolyse de l'ATP.

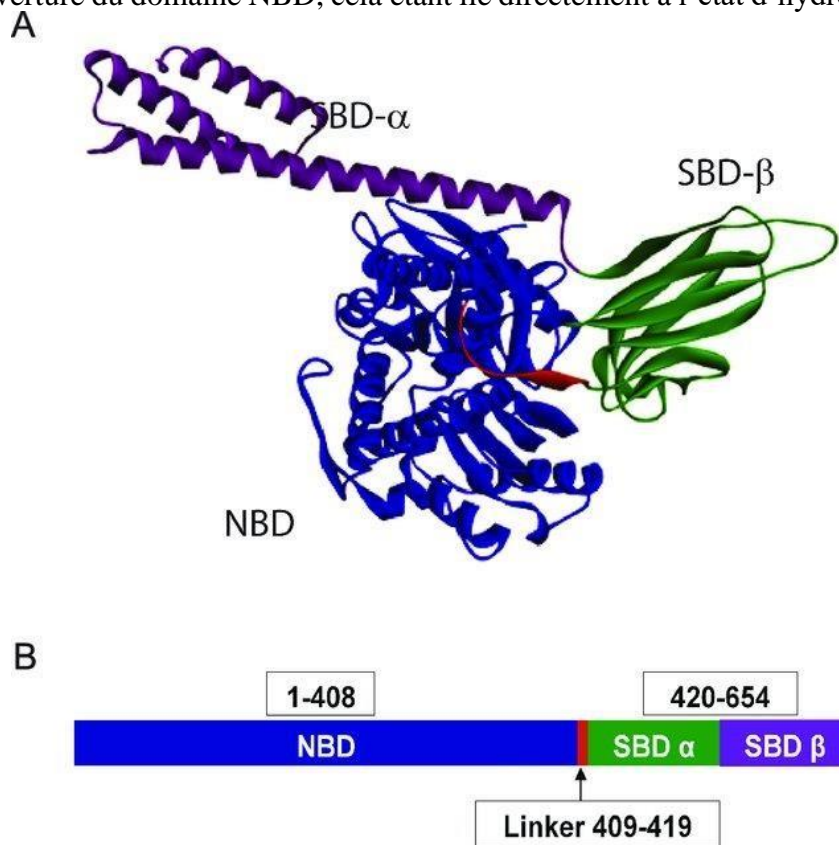


Figure 12 : Représentation tridimensionnelle (A) et linéaire (B) de la protéine chaperon Grp78. (D. D. Shah et al., 2017)

Si de l'ATP est fixé au domaine NBD, le domaine SBD va adopter une conformation tridimensionnelle limitant grandement son affinité pour le substrat. A l'inverse, si de l'ADP est fixé au domaine NBD, l'affinité du domaine SBD pour son substrat est grandement augmentée permettant ainsi l'interaction. Cette alternance d'état permet donc de réguler la fixation ou la libération du substrat de Grp78 (120).

Grp78 est également connue pour interagir avec sept chaperonnes HSP40 nommées Erdj1-7. Ces Erdjs font parties de la famille des Hsp40, elles se fixent sur les protéines mal formées et recrutent de Grp78 pour permettre la prise en charge des protéines mal repliées (121,122). Elles sont aussi impliquées dans la catalyse de l'hydrolyse de l'ATP permettant l'activation de Grp78 étant donné que son activité ATPase de base est relativement faible (123). Une autre catégorie de chaperons interagissant avec Grp78 est les *nucleotide-exchange factor*. Parmi eux, nous retrouvons Grp170 et Sil1 qui vont permettre la dissociation d'une molécule d'ADP du domaine NBD en le déstabilisant, et engendrant la fixation d'une nouvelle molécule d'ATP afin de perpétuer le cycle de l'hydrolyse (124).

b. Fonctions

Comme décrit précédemment, Grp78 a un rôle primordial dans la prise en charge des protéines en cours de repliement dans le RE pendant leur synthèse, afin de les aider à acquérir la conformation tridimensionnelle. Au cours de l'ERAD, Grp78 joue également un rôle très important dans la linéarisation des protéines qui sont en cours de translocation vers le cytoplasme dans le but d'être dégradées par le protéasome 26S. De plus, il a été décrit que Grp78 pouvait intervenir dans la régulation de la concentration de calcium dans le RE en bloquant la fuite de tels ions via la fermeture du canal Sec61 (125) ou en les chélatant via son domaine NBD (126).

Au-delà de ses effets bénéfiques sur la cellule, il a aussi été montré depuis quelques années que Grp78 pouvait se localiser à la membrane plasmique (127). Cela peut avoir des conséquences néfastes pour l'organisme car elle va alors être un inducteur de voies de signalisation impliquées dans de nombreux cancers tels que des leucémies, le cancer du pancréas, le cancer colorectal, le cancer du sein ou encore le cancer de la prostate (128). Pour ne citer qu'une de ces voies, Grp78 est un récepteur de nombreux ligands dont la complexation va mener notamment à l'activation de la voie *phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B*. Cette dernière étant bien connue pour ses effets sur la survie, la prolifération, l'induction de métastases ou l'induction de résistances aux traitements chimio-thérapeutiques (Figure 13) (127).

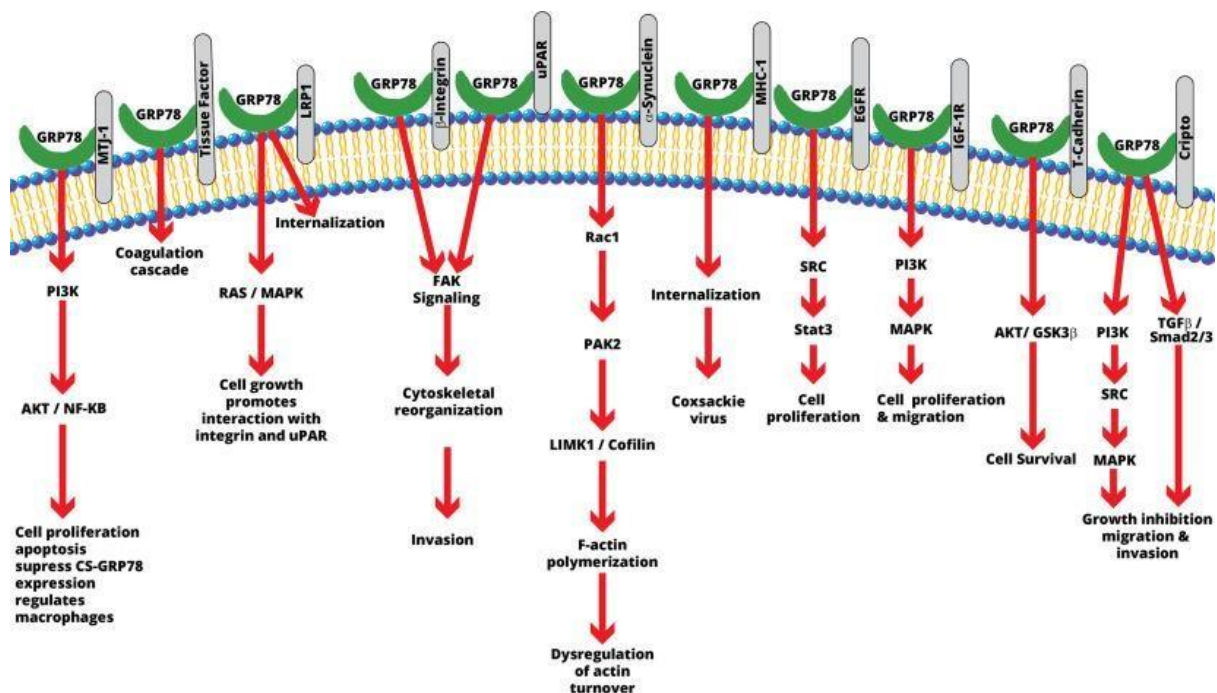


Figure 13 : Schéma représentant les différentes voies de signalisation déclenchées par la localisation membranaire de Grp78. (U. Gopal and S. V. Pizzo, 2018)

Malgré tout, l'effet de Grp78 sur la régulation du mécanisme de l'UPR sera celui qui nous intéresse dans ce projet de thèse. A l'heure actuelle Grp78 est considérée comme la protéine clé régulant le déclenchement de l'UPR. Les trois acteurs principaux des voies de signalisation constituant l'UPR précédemment cités IRE1, PERK et ATF6 sont, dans leur état inactif, ancrés dans la membrane du RE et fixés à Grp78.

A un état basal, Grp78 aide les protéines mal repliées pendant et après leurs étapes de synthèse, et possède une plus grande affinité pour celles-ci que pour les effecteurs de l'UPR (129–131). Lors d'une accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE, Grp78 se dissocie alors des effecteurs de l'UPR ce qui mène à l'activation des voies de l'UPR (129).

2. IRE1

IRE1 est le premier des trois acteurs centraux régissant la régulation de l'UPR à avoir été décrit, car il est retrouvé chez la levure et donc relativement facile à étudier (132,133). Cette protéine possède deux isoformes dans les organismes eucaryotes. Le premier, et le plus étudié des deux, est IRE1 α qui est exprimé dans tous les tissus de l'organisme tandis que le deuxième, IRE1 β , est exprimé uniquement au niveau de l'épithélium intestinal et pulmonaire dans des cellules productrices de mucus (134,135). Nous ne parlerons que d'IRE1 α dans ce manuscrit car, malgré le fait que notre projet de recherche soit centré sur l'appareil respiratoire, notre modèle cellulaire ne produit pas de mucus.

IRE1 α est une protéine transmembranaire de type I composée d'une partie N-terminale en contact avec la lumière du RE sensible aux variations de stress de cet organite. Cette région contient des domaines de fixation de la protéine Grp78 permettant d'inhiber l'oligomérisation, et donc l'activation, d'IRE1 α via un encombrement stérique (Figure 14). Un autre article à récemment vu le jour stipulant que l'activation de IRE1 pouvait également être possible par la fixation de protéines mal formées à ses domaines luminaux (134).

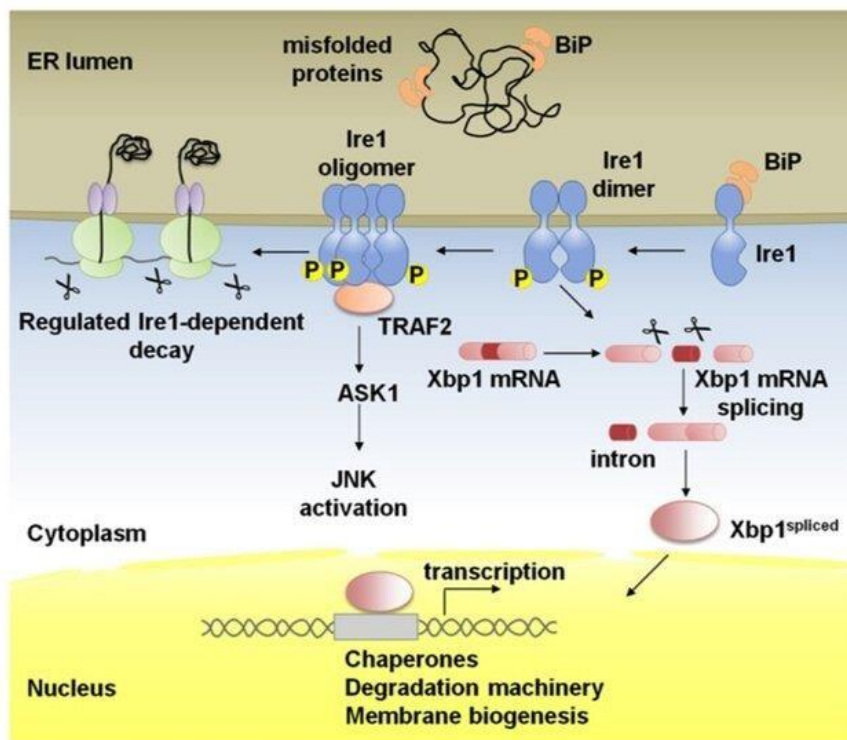


Figure 14 : Schéma représentant la voie IRE1 et les effets de son activation. (D. S. Coelho and P. M. Domingos, 2014)
Après dissociation de Grp78 d'IRE1, ce dernier s'oligomériser ce qui déclenche la transphosphorylation de ses domaines cytoplasmiques. S'ensuit l'activation d'une cascade de signalisation de différentes kinases d'une part, et le clivage de mRNA via son activité endoribonucléasique.

IRE1 α possède également une partie C-terminale cytosolique d'où découle toute son activité.

En effet, cette partie présente un domaine d'activité kinase et endoribonucléasique qui s'active lors de sa dimérisation par ses domaines luminaux (Figure 15) (136).

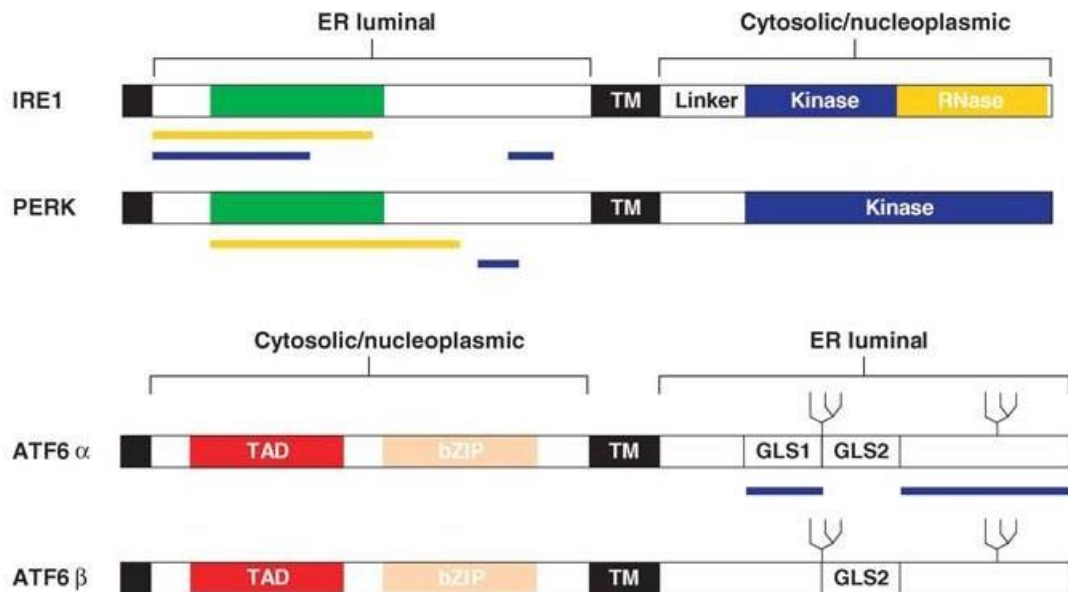


Figure 15 : Représentation schématique de la structure primaire des effecteurs de l'UPR IRE1, PERK et ATF6 ainsi que leurs différents domaines. (M. Schröder and R. J. Kaufman, 2005)
Les bars jaunes correspondent aux domaines d'oligomérisation, les bars bleues représentent les interactions avec Grp78.

Concernant son activité endoribonucléasique, tout commence par l'excision d'un intron de 26 nucléotides sur l'ARNm du facteur de transcription *X-box binding protein 1* (XBP1, appelé XBP1s après clivage) ce qui amène à un décalage du cadre de lecture pendant sa traduction. XBP1s est alors transloqué à travers la membrane nucléaire pour déclencher la transcription de gènes cibles (137). Ces gènes codent des protéines impliquées dans la synthèse de protéines chaperons ou dans la régulation de la sécrétion conventionnelle, dans l'ERAD ou dans la synthèse lipidique (138). En dehors du clivage de XBP1, l'autre processus lié à cette activité, appelé *regulated IRE1-dependent decay* (RIDD), joue un rôle primordial dans la régulation de la synthèse protéique globale. En effet, RIDD peut dégrader divers ARNm ou microARN, diminuant ainsi le nombre d'ARNm à traduire et donc de protéines à produire. RIDD peut induire également l'apoptose si tous les processus mis en place ne suffisent pas à rétablir l'homéostasie globale (Figure 14) (139).

L'activité kinase de IRE1 α est régulée par l'intervention de nombreux acteurs moléculaires comme des kinases, des phosphatases ou des protéines impliquées dans l'apoptose pour inhiber ou activer les cascades de signalisation liées à cette voie. Un acteur central retrouvé dans de nombreuses études est le *Tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 2* (TRAF2) qui conduit à l'activation des voies régulées par l'*Apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1) et de *c-Jun-N-terminale kinase (JNK) 1* (Figure 14) (140). TRAF2 déclenche notamment la production de TNF α et de NF- κ B ce qui peut avoir de nombreuses conséquences surtout au niveau du déclenchement de réponse inflammatoire et de l'apoptose. JNK1 de son côté promeut l'activation des caspases 9 et 3 médiée par le relargage de cytochrome c dans le

cytosol. De plus, il a été montré récemment que la voie IRE1 α -TRAF2-ASK1-JNK1 pouvait jouer un rôle très important dans la formation des autophagosomes pendant l'autophagie. Nous reviendrons sur ce point plus loin, et nous verrons aussi comment cela peut affecter le transport non conventionnel de protéines mutées.

3. PERK

PERK est une protéine transmembranaire de type I ancrée dans la membrane du RE avec des similarités avec IRE1 dans la composition de son domaine luminal. Sa principale différence avec IRE1 est que PERK possède uniquement une activité kinase au niveau de son domaine cytosolique. La deuxième différence notable concerne les régions de fixation de Grp78 à son domaine luminal (Figure 15). En effet, PERK possède une région où va pouvoir se fixer Grp78 et qui ne chevauche pas son domaine d'oligomérisation. A la différence de IRE1 est que, à défaut de réaliser un encombrement stérique, la fixation de Grp78 pourrait induire un changement de conformation du domaine luminal de PERK et ainsi empêcher son homooligomérisation (108). Cependant, une fois Grp78 dissociée, PERK va pouvoir former des oligomères ce qui va conduire à une transphosphorylation de ses différentes sous-unités. Il va en découler la phosphorylation de la sous-unité α de l'*eucaryotic translation initiation factor-2* (eIF2 α) inhibant lui-même eIF2b (141). eIF2b est un complexe protéique permettant de convertir le GDP lié à eIF2 par du GTP. Ce complexe eIF2-GTP est vital pour le fonctionnement cellulaire car il est au centre de la traduction protéique. En effet, eIF2-GTP se fixe à l'ARN transférase chargé en méthionine, ce qui est la première étape pour initier la traduction (142). La diminution du taux de eIF2-GTP global va donc ralentir grandement la traduction des protéines. Normalement, cette dernière est initiée dans des zones appelées *upstream open reading frames* (uORFs) situés en 5' de l'ARNm. Un taux de recyclage normal entre eIF2-GDP et eIF2-GTP est assez rapide pour détacher le ribosome de l'ARNm et d'initier à la suite d'autres traductions en commençant par ces uORFs. Mais après l'activation de PERK ce cycle est beaucoup plus long, ce qui va laisser le temps au ribosome déjà en place d'initier la traduction des *downstreams ORFs* (dORFs) (143). Il va donc en découler la synthèse de facteurs qui ne sont pas traduits si PERK n'est pas activé, et parmi eux est retrouvé notamment ATF4 (Figure 16) (144).

ATF4 est la protéine qui initie la transcription des gènes cibles de la voie PERK. Nous pouvons en citer deux principaux qui sont *CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-homologous protein* (CHOP) et ATF3 (145). CHOP est un facteur de transcription qui conduit à la production de protéines liées au déclenchement de l'apoptose cellulaire, tandis que ATF3 permet notamment la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle de la voie PERK. En effet, ATF3 va permettre la production de la protéine *growth arrest and DNA-damage-inducible*

protein 34 (GADD34) (146,147). GADD34 est une phosphatase qui va déphosphoryler eIF2 α et permettre la mise en place de cette boucle de rétrocontrôle.

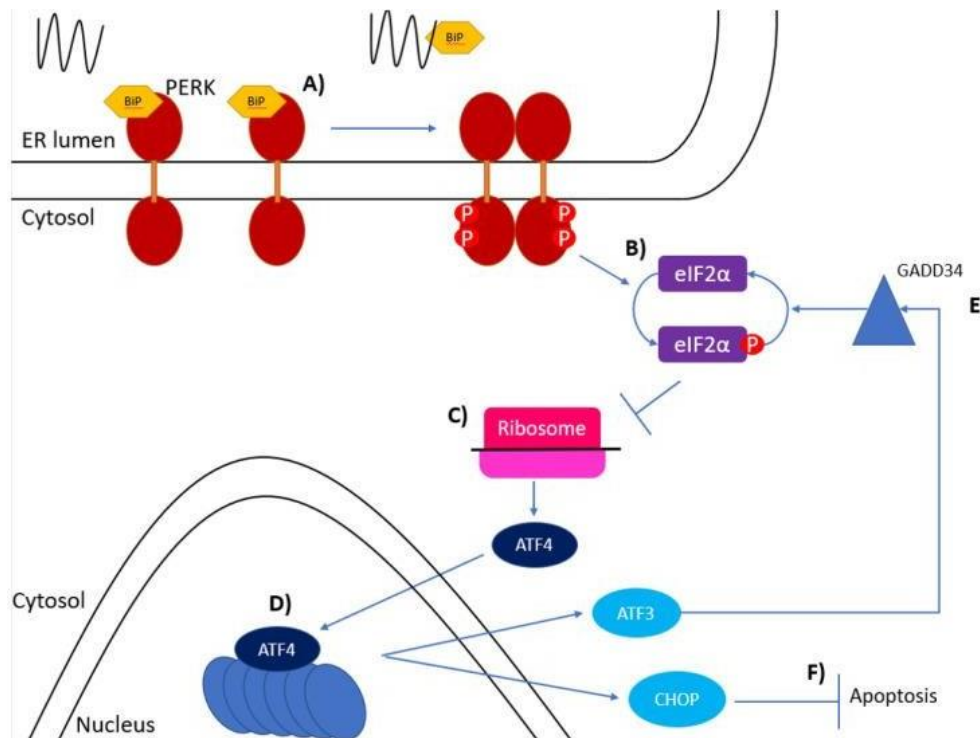


Figure 16 : Schéma représentant la voie PERK ainsi que les effets de son activation. (A. Read and M. Schröder, 2021) Une fois Grp78 dissociée PERK, une oligomérisation se crée et conduit à une transphosphorylation des différentes sous-unités de PERK. Cette activation de cette voie va amener à phosphoryler eIF2 α , engendrant la réduction de synthèse de la majorité des protéines, mais induisant la synthèse d'autres telles que ATF4. ATF4 est liée notamment à la régulation de CHOP, impliquée dans l'apoptose. ATF4 permet également d'auto-réguler la voie PERK.

4. ATF6

a. Activation et fonction de ATF6

ATF6 est le dernier des trois acteurs principaux de l'UPR à avoir été découvert. C'est une protéine transmembranaire de type II existant sous deux isoformes qui sont ATF6 α et ATF6 β (148). ATF6 α possède un pouvoir transcriptionnel plus fort qu'ATF6 β mais moins pérenne dans le temps que ce dernier. De plus, ATF6 β joue un rôle dans la régulation d'ATF6 α en inhibant son activité (149). Au-delà de cette différence, ces deux isoformes partagent les mêmes processus d'activation et suivent le même cheminement dans la cellule. Sauf si mentionné clairement, lorsque nous mentionnerons ATF6 dans ce manuscrit, cela fera référence à ses deux isoformes.

ATF6 est liée sous sa forme inactive à Grp78 est ancrée dans la membrane du RE tout comme IRE1 et PERK. La différence réside sur son mode d'activation qui reste encore méconnu à ce jour car deux hypothèses existent. Lorsque Grp78 est liée à ATF6, des domaines d'adressage à l'appareil de Golgi dans le domaine luminal d'ATF6 sont masqués. La dissociation de Grp78 permettrait donc de les révéler et de permettre à des transporteurs d'acheminer ATF6 jusqu'à l'appareil de Golgi (130,150). La deuxième hypothèse décrit que les ponts disulfures présents sur le domaine luminal d'ATF6, permettant son oligomérisation, seraient réduits lors de la mise en place de l'UPR (151). Cela mène à la monomérisation d'ATF6 et à son transport jusqu'à

l'appareil de Golgi (152). Quoiqu'il en soit, une fois cette voie déclenchée, ATF6 migre jusqu'à l'appareil de Golgi (113). Elle va alors s'ancrer dans la membrane golgienne où elle va subir deux clivages successifs par des sérines protéase qui sont la S1P et la S2P (153). S1P reconnaît la séquence RXXL (où X pouvant être n'importe quel acide aminé) sur une portion d'ATF6 se situant dans la lumière de l'appareil de Golgi (Figure 18). S2P entre ensuite en jeu en clivant la partie intramembranaire en N-terminale (154) ce qui va permettre de libérer ATF6 sous sa forme active dans le cytosol. ATF6 va ensuite migrer jusqu'au noyau, transloquer à travers la membrane nucléaire et permettre la transcription de gènes cibles de cette voie (Figure 17). Parmi eux nous pouvons en citer certains permettant la synthèse de protéines chaperons comme Grp78, Grp94 ou des PDI mais aussi l'expression du gène codant XBP1, de la protéine pro-apoptotique CHOP ou de gènes permettant la mise en place de l'ERAD (104). ATF6 permet également d'augmenter le volume du RE, notamment par la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (Figure 17) (155).

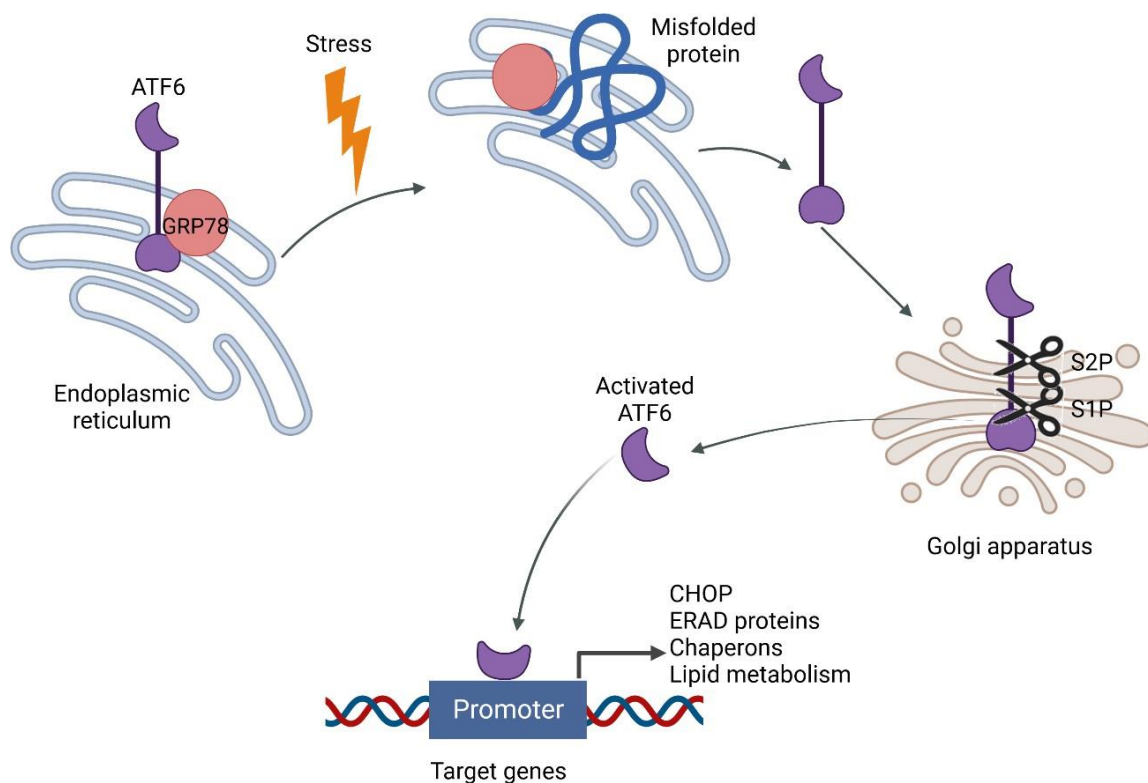


Figure 17 : Schéma représentant l'activation de la voie ATF6. (Créé par Biorender)

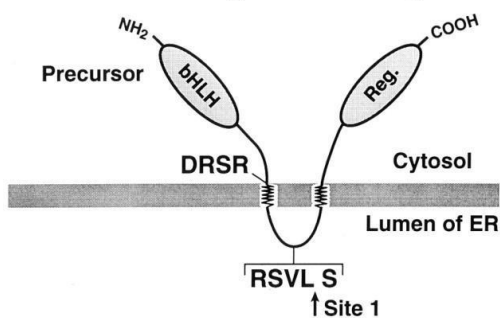
Grp78 se dissocie d'ATF6, alors ancrée dans la membrane du RE. ATF6 migre jusqu'à l'appareil de Golgi où elle va subir deux clivages successifs par les sérines protéases S1P et S2P. La forme activée d'ATF6 est alors relarguée dans le cytosol, transloque à travers la membrane nucléaire et agit en tant que facteur de transcription en activant les gènes cibles de cette voie.

b. Site-1 protease

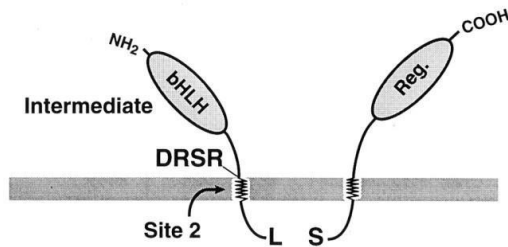
La S1P, également nommée *membrane-bound transcription factor site-1 protease MBTPS1* ou *subtilisin/kexin-isozyme 1 SKI-1*, est une protéine centrale dans ce projet de thèse. C'est une sérine protéase ancrée dans la membrane de l'appareil de Golgi et dont le site actif se situe du côté luminal de cet organe (156).

Ces effets ont été décrit pour la première fois dans le cadre du clivage des SREBPs (157). Ces protéines régulent la synthèse d'acides gras et du cholestérol via notamment les *ER enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase/synthase* ou le *low-density lipoprotein receptor* (94,158). La séquence RXXL précédemment mentionnée est une séquence que la S1P reconnaît, qui varie d'une cible à l'autre et qui permet sa fixation et le clivage de son substrat (RSVL chez les SREBPs) (Figure 18) (157). Une étude ultérieure a montré que ATF6 suivait la même séquence d'activation que pour les SREBPs, et que leur activation était indépendante l'une de l'autre. ATF6 est reconnue par la S1P sur son site RHLL situé du résidu 416 à 419 (153), permettant le clivage d'une portion luminale d'ATF6. ATF6 est ensuite clivée par la S2P ce qui termine ces étapes de maturations, menant la forme active d'ATF6 à transloquer au-travers de la membrane nucléaire.

Site 1 Cleavage – Sterol-Regulated



Site 2 Cleavage – Nonregulated



Release of Mature SREBP

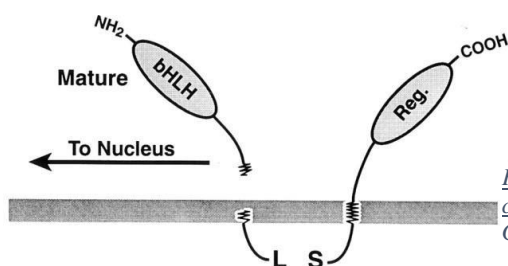


Figure 18 : Site de clivages des sérines protéase S1P et S2P, dans le cadre de la régulation des protéines SREBPs. (M. S. Brown and J. L. Goldstein, 1997)

C. L'apoptose déclenchée par la réponse aux protéines mal formées

Si tous les processus déclenchés par les voies précédemment décrites sont suffisants, la cellule va pouvoir réussir à restaurer son homéostasie globale. Dans le cas contraire, la cellule va déclencher sa propre mort par apoptose afin de ne pas porter préjudice au reste de l'organisme, et l'UPR y intervient à différents niveaux. Il est important de noter que l'apoptose

possède deux grandes voies d'activation différentes : la voie intrinsèque qui passe par les mitochondries et la libération de cytochrome c dans le cytoplasme, et la voie extrinsèque médiée par l'activation de récepteurs de mort produisant une inflammation générale et conduisant à la mort cellulaire programmée.

La première voie de déclenchement de l'apoptose passe par la production de la protéine CHOP faisant suite à l'activation des voies PERK et ATF6. Dans un premier temps, CHOP augmente la synthèse de protéines ce qui mène à la formation de radicaux libres oxygénés, CHOP génère également une déplétion globale de la quantité d'ADP/ATP dans la cellule (159). CHOP va permettre également la transcription des gènes codant pour les protéines pro-apoptotiques BIM, NOXA et PUMA, qui sont des activateurs du duo BAX/BAK et directement impliqués dans la voie apoptotique intrinsèque (Figure 19). Enfin, CHOP permet la production de GADD34 qui a un effet sur la régulation de la voie PERK. GADD34 peut participer au déclenchement de l'apoptose avec l'expression du *death receptor 5* (DR5), un membre important dans l'apoptose (Figure 19) (160).

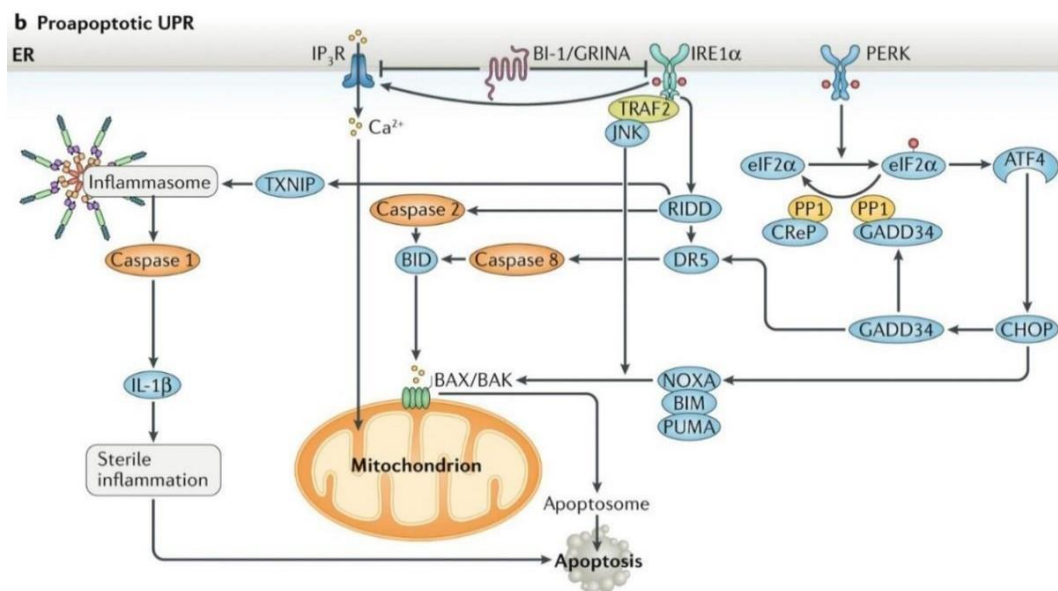


Figure 19 : Schéma récapitulatif de la mise en place de l'apoptose par l'intervention des voies IRE1 et PERK. (Modifié de C. Hetz et al., 2020)

Même si son implication est encore méconnue, la seconde voie de déclenchement fait intervenir IRE1 soit par son système RIDD soit par son activité kinase via la voie TRAF2-JNK. RIDD joue sur le déclenchement de l'apoptose via la voie extrinsèque en permettant la transcription de *thioredoxin-interacting protein* (TXNIP dans la figure 19) ce qui déclenche une réponse inflammatoire et l'activation de la caspase 1.

Mais RIDD dégrade des miARN censés réprimer la transcription de la caspase 2, elle-même responsable de l'activation de la protéine pro-apoptotique BID, ce qui montre également une implication de RIDD dans la voie intrinsèque (161).

Enfin, l'activité kinase d'IRE1 via la voie TRAF2-JNK mène à l'activation des protéines BAX et BAK précédemment mentionnées. Cela se produit en phosphorylant des protéines anti-

apoptotique de la famille BCL-2 levant ainsi l'inhibition de leurs homologues pro-apoptotiques. BAX et BAK mènent à l'apoptose par la voie intrinsèque, mais peuvent aussi migrer jusqu'à la membrane du RE pour activer un canal, l'*inositol triphosphate receptor* (IP₃R dans la figure 19), faisant rentrer une grande quantité de calcium activant la cascade de signalisation des caspases (162).

D. Pathologies

L'UPR étant un mécanisme vital pour la survie d'un organisme et dépendant de l'intervention de multiples acteurs, la moindre dérégulation peut mener à l'apparition de pathologies (Figure 20). Cette partie n'a pas pour but de lister de manière exhaustive toutes les pathologies liées au dysfonctionnement de l'UPR. Cependant, il en existe une grande variété et les différents facteurs de l'UPR peuvent avoir des rôles totalement opposés dans certains cas.

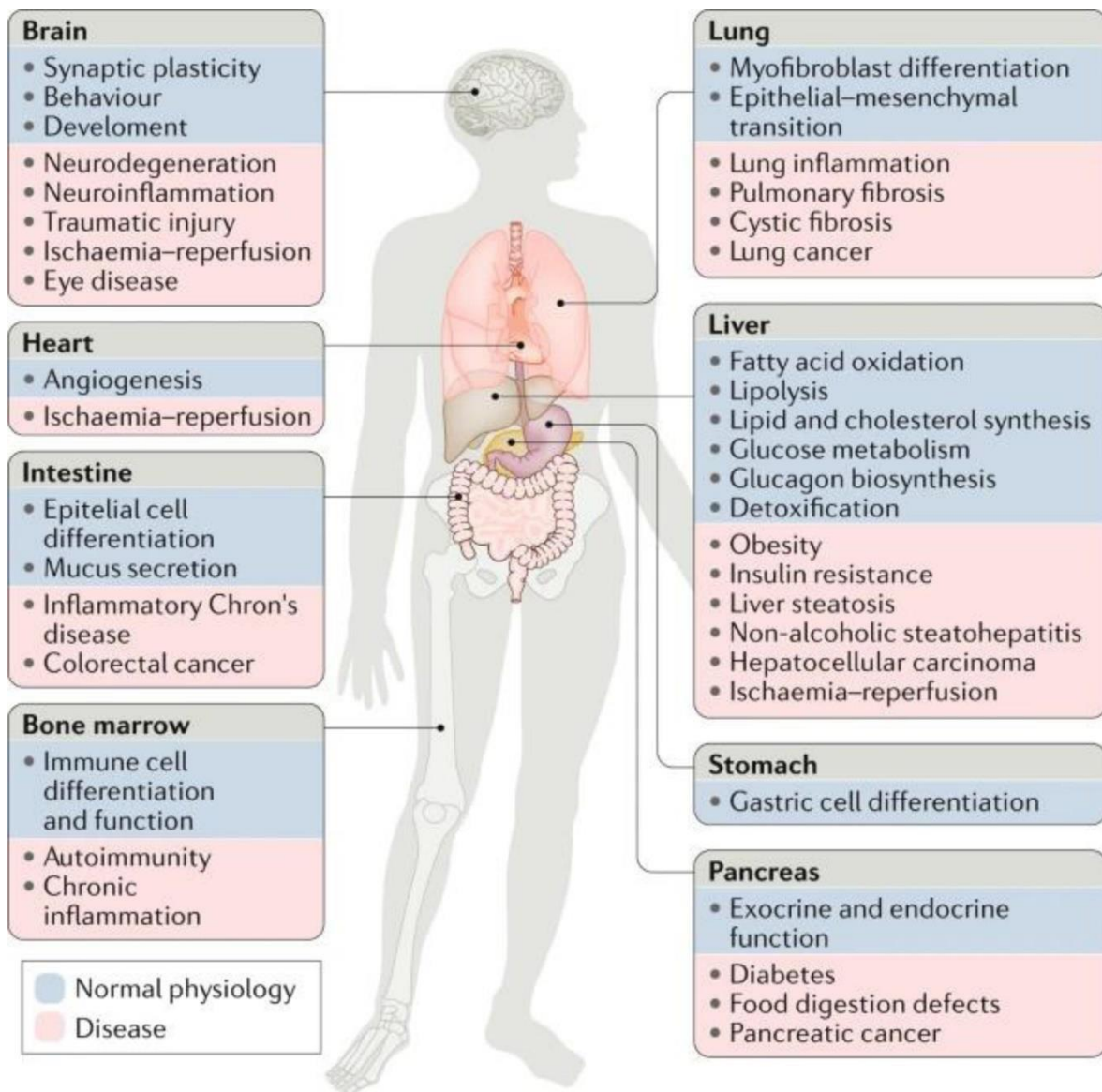


Figure 20 : Listes des rôles physiologiques et pathologiques de l'UPR dans l'organisme humain. (Hetz et al., 2020)
En bleu sont représentés les implications directes des effecteurs de l'UPR sur des processus métaboliques, en rouge la conséquence du dysfonctionnement de ce mécanisme pour chaque zone de l'organisme concerné.

1. Maladies métaboliques et diabète

Le pancréas d'un individu sain réagit à la prise d'un repas en sécrétant de l'insuline, permettant l'assimilation ainsi que le stockage du glucose sanguin dans le foie et les muscles. L'insuline est sécrétée par les cellules β situées au sein des îlots de Langerhans du pancréas, sa synthèse étant multipliée par dix dans un état postprandial. Dans le cas du diabète de type 2, l'insuline produite ne suffit plus à réduire suffisamment la glycémie globale, on parle alors d'insulinorésistance. Pour compenser cela, les cellules β vont surproduire de l'insuline ce qui peut conduire à l'accumulation de cette protéine sous une forme mal repliée. Cela va être à l'origine de l'apparition d'un stress cellulaire et donc du déclenchement de l'UPR. A terme les cellules s'épuisent, perdent en fonction et finissent par mourir.

L'intervention des différentes voies de l'UPR dans ce cas est assez variée. D'une part, la voie PERK est connue pour réguler la synthèse de la proinsuline (163). L'inactivation de cette voie, notamment via des mutations sur le gène codant pour eIF2 α , mène à la mise en place du syndrome rare Wolcott-Rallison chez les diabétiques, où les individus ne sécrètent plus d'insuline (164). D'autre part, dans le cadre du diabète de type II, la délétion du gène CHOP a montré dans des modèles murins une augmentation de la fonction globale des cellules β et donc du contrôle global du taux de glucose dans l'organisme (165). Il a également été montré que, en plus de protéger de l'apoptose, la délétion de CHOP permet de protéger du stress oxydatif et d'augmenter le repliement des protéines dans le RE (166).

Les voies IRE1 et ATF6 sont également impliquées dans cette pathologie. XBP1 est impliquée dans la production d'insuline et la maturation de la proinsuline (167). Mais il a également été montré que les surexpressions de XBP1 et d'ATF6 α peuvent mener à l'inhibition de l'expression de l'insuline, conduisant à la mort des cellules β (168). L'activité endoribonucléasique d'IRE1 dégrade l'ARNm de l'insuline réduisant ainsi sa synthèse. De plus, l'activité kinase de cette même voie est impliquée dans la phosphorylation du récepteur à l'insuline. Mis bout-à-bout, ces effets participent activement au développement d'obésité et d'insulino-résistance (169).

Une protéine très importante dans la régulation du métabolisme lipidique dont l'activation dépend de l'insuline est SREBP1 (170). SREBP-1c, un de ses isoformes, est exprimée notamment dans le foie et les tissus adipeux qui sont des lieux très importants dans le stockage d'énergie sous forme de graisses. L'action de SREBP-1c mène à l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et dans la lipogenèse (171). La stéatose hépatique est une maladie caractérisée par l'accumulation de graisse dans le foie et dans les tissus adipeux. Cela peut conduire à de l'obésité, de l'hypertension artérielle voire même à la mise en place d'un diabète de type II. Cette maladie est notamment due à une augmentation incontrôlée de la lipogenèse, passant par exemple par l'action de SREBP-1c, et à la diminution de l'expression de lipoprotéines qui permettent le transport du cholestérol du foie vers d'autres organes (172).

L'accumulation d'insuline produite et la lipogenèse suractivée conduisent à une lipotoxicité et à une forme d'inflammation menant à un stress cellulaire. Pour répondre à tout cela, l'UPR est déclenché et se combine avec l'effet de la protéine *hepatic-specific adenosine monophosphate (AMP)-responsive element-binding protein* (CREBH) qui permet l'expression de gènes impliqués dans la lipolyse, la lipophagie ou dans le métabolisme du glucose (173). De plus, il a été montré que Grp78 inhibe l'activation de SREBP-1c limitant donc les effets négatifs qui sont liés à la suractivité de cette protéine (174). D'un autre côté, XBP1 induit la lipogenèse d'une part et diminue la gluconéogenèse d'une autre (175,176). Enfin, ATF6 α a montré des effets contraires vis-à-vis de la néoglucogenèse déclenchée par CREBH participant à l'accumulation de lipides dans les organes concernés (177).

2. Maladies inflammatoires

L'UPR et l'inflammation sont deux processus très étroitement liés. PERK et IRE1 par exemple sont deux voies permettant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'interleukine 6 et l'interleukine 8 (173). La voie IRE1-XBP1 est également un acteur central dans la maturation et la différenciation des lymphocyte B en plasmocytes (178), la prolifération et la survie des cellules dendritiques (179) et sa dérégulation peut mener au développement de maladies cardiaques.

L'athérosclérose est une pathologie qui se caractérise par une accumulation de cholestérol au niveau des parois des vaisseaux sanguins. Ces lipides vont finir par s'oxyder et déclencher une réponse inflammatoire, recrutant les macrophages sur le site concerné. Dans un cas normal, les macrophages vont capturer les lipides pour essayer de désengorger le vaisseau sanguin. Cependant, en absence de régulation, les macrophages vont accumuler les lipides en leur sein ce qui va conduire à leur apoptose. Ils se retrouvent alors piégés dans cette zone ce qui va bloquer le passage du sang. Cette anomalie peut évoluer en la formation d'un thrombus qui peut, à terme, se fragmenter et migrer tout le long de la circulation jusqu'à bloquer un nouveau vaisseau sanguin de plus petite taille, privant les organes concernés d'apport sanguin déclenchant ainsi une ischémie. Plusieurs organes peuvent être touchés : l'ischémie cérébrale ou plus communément appelé l'accident vasculaire cérébral, l'ischémie cardiaque ou infarctus du myocarde, l'ischémie mésentérique qui touche le côlon, l'intestin grêle ou le pancréas et l'ischémie des membres inférieurs qui mène au blocage des artères des jambes.

L'UPR peut jouer différents rôles dans ce contexte. Au niveau des plaques d'athérome, la voie IRE1 α -XBP1 semble avoir un effet négatif sur l'évolution de cette anomalie car sa stimulation participe au maintien de l'inflammation locale. L'inhibition d'IRE1 α par un inhibiteur spécifique, le STF-083010, a d'ailleurs montré une diminution de la taille des plaques d'athérome, de l'inflammation locale et de la production de cytokine dans un modèle murin (180). Au niveau des organes subissant une ischémie par contre, l'UPR semble jouer un rôle positif sur l'évolution de ces anomalies. Par exemple, la voie ATF6 à un effet positif sur

l'évolution de l'ischémie-reperfusion qui est caractérisée par l'accumulation d'espèces réactives à l'oxygène toxiques pour l'environnement cellulaire. ATF6 promeut l'activité de la catalase qui est une enzyme permettant de lutter contre l'accumulation de tels composés (181). Dans l'infarctus du myocarde, XBP1 augmente la synthèse du facteur pro-angiogénique *vascular endothelial growth factor-A*, ce qui permet au tissu de s'adapter aux conditions hypoxiques en remodelant la circulation sanguine et de réduire au maximum les dégâts causés par le manque d'apport en oxygène (182).

3. Cancers

De par son implication plus ou moins directe dans de nombreux processus cellulaires différents, l'UPR est étroitement lié également au développement tumoral. La voie IRE1 α a montré une implication dans divers types de cancers comme dans le cancer du sein, le cancer colorectal, des myélomes multiples ou des gliomes (183). L'activation de PERK est liée au développement du cancer colorectal, de l'œsophage et du sein (184,185). Il y a moins de preuves d'implications directes de la voie ATF6 dans le développement tumoral, cependant un article a relevé son activation dans des mélanomes (186).

Tous les effets positifs de l'UPR précédemment décrits sur la survie cellulaire peuvent cependant être délétères dans le cas d'apparition de tumeur dans un organisme. En effet, les cellules cancéreuses ont la possibilité de modifier les processus métaboliques dans le but d'améliorer leur survie, leur prolifération et leurs capacités invasives. Il n'est donc pas étonnant que les différentes branches de l'UPR soient activées de manière à aggraver le développement tumoral. Comme dit précédemment, la voie IRE1 α -XBP1 permet la synthèse de facteurs angiogéniques ce qui aide les tumeurs en pleines croissances à se revasculariser et ainsi continuer leur développement (183). De même, la voie PERK est liée à l'expression de facteurs pro-survies et pro-angiogéniques et permet même de réduire la dégradation d'ARNm, ce qui est bénéfique pour la croissance tumorale (185). La voie ATF6 α n'est pas en reste non plus car sa surexpression est liée à l'activation de la *mammalian target of rapamycin* (mTOR), l'inhibiteur principale du processus de l'autophagie (187). Enfin, Grp78 se retrouve relocalisée à la membrane plasmique, où elle promeut l'activation de cascades de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire (184,188). Elle participe donc activement au développement de résistances vis-à-vis des chimiothérapies dans des cancers agressifs (189).

4. Maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives sont d'autres pathologies où l'activation de l'UPR a un effet mais, comme pour les précédents cas cités, son implication est différente en fonction du contexte étudié. Les principales voies ayant un effet, positif ou négatif sur ces pathologies, sont PERK et IRE1 α , ATF6 ayant été moins étudiée que ces deux autres voies. Parmi ces maladies nous pouvons citer notamment la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, d'Huntington, la sclérose latérale amyotrophique (plus communément appelée maladie de Charcot) ou encore diverses maladies neurodégénératives auto-immunes démyélinisantes.

La plupart de ces maladies ont pour cause l'accumulation de protéines dans la lumière du RE ce qui va avoir plusieurs conséquences.

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, il y a une accumulation d'oligomères de β -amyloïde, conduisant à une dérégulation de l'homéostasie calcique du RE conduisant à l'apoptose cellulaire (190). De plus, il y est retrouvé également une accumulation de la protéine Tau qui va se lier à des composants de l'ERAD et réduire l'efficacité de ce processus (191). Chez la souris, il a été montré que la surexpression de la voie IRE1 α -XBP1 augmente la toxicité liée à l'accumulation de la β -amyloïde, notamment en augmentant son expression via la stimulation de la protéine kinase JNK3 (192). L'inhibition de la voie PERK a montré, également dans un modèle murin, une récupération des capacités cognitives (193).

Dans le cas de la maladie de Parkinson c'est l' α -synucléine qui va inhiber le transport des protéines du RE vers l'appareil de Golgi et donc altérer leur maturation, causant un stress du RE (194). L'implication de XBP1 a été étudiée dans un modèle murin mais a donné lieu à deux effets totalement inverses en fonction de l'âge de l'animal. Chez les jeunes individus, l'inhibition de XBP1 permettait de protéger les neurones dopaminergiques d'une neurotoxicité. Alors que chez l'adulte, cela menait à un stress chronique menant à la mort de ces mêmes neurones (195). La voie PERK a montré également une certaine implication dans ce contexte pathologique, car l'inhibition de GADD34 montre un effet protecteur vis-à-vis de la dégénérescence neuronal (196).

Pour la sclérose latérale amyotrophique, plusieurs mécanismes sont décrits. La protéine mutée *superoxide dismutase 1* interagit avec la Derlin-1 inhibant son activité dans le processus de l'ERAD (197). D'autres études ont montré que cette protéine mutante pouvait séquestrer Grp78 et des PDI les empêchant de mener à bien leurs fonctions (198). Une mutation sur la *vesicle-associated protein-associated protein B* conduit à une interaction avec ATF6 et XBP1 inhibant leur activité en modifiant leur localisation cellulaire (199). Il a été montré que l'inhibition de PERK, via l'inhibition de GADD34, de ATF4 ou de la phosphorylation de eIF2 α , améliorait la survie et l'efficacité des neurones moteurs (198). De plus, l'activation de la voie IRE1 α -XBP1 a montré une augmentation du déclenchement de l'autophagie, ce qui aurait pour conséquence de dégrader le surplus de protéines qui se sont accumulées dans le RE (200).

Concernant la maladie de Huntington, l'altération de la protéine huntingtine, par des mutations touchant le gène codant pour cette protéine, mène à des dysfonctionnements dans le processus ERAD à cause d'interactions protéine-protéine anormales (201). L'huntingtine peut également interagir avec des composants du RE et modifier sa conformation, conduisant à un stress chronique de cet organite (202). Comme dans le cas de la sclérose latérale amyotrophique, l'activation de la voie IRE1 α -XBP1 permet de réduire la quantité de protéines accumulées via le processus de l'autophagie (203).

En conclusion de cette partie, l'UPR joue des rôles majeurs dans de nombreux organes. Parmi les maladies qui résultent de son dysfonctionnement il y a aussi la mucoviscidose, une

maladie génétique. Elle a volontairement été mis de côté dans cette partie car, étant au cœur de ce sujet de thèse, nous allons lui consacrer une partie entière dans la suite de ce manuscrit. Avant cela, le mécanisme d'autophagie doit être développé car il est très étroitement lié à l'UPR et joue un rôle non négligeable dans la mucoviscidose

III. Autophagie

A. Généralités

L'autophagie est un processus hautement conservé durant l'évolution, et dont le terme a été utilisé pour la première fois par Christian de Duve dans les années 1960 (204). Ce mécanisme est déclenché notamment par un stress cellulaire ou par la déprivation de nutriments. L'autophagie est considérée comme centrale pour le recyclage de composants cellulaires, ainsi que pour la dégradation d'organites et de protéines non fonctionnels. Cette dégradation permet notamment de prévenir l'apparition de conditions pathologiques tout en fournissant de l'énergie à la cellule. Etant présent chez tous les règnes de l'être vivant, beaucoup d'études se sont basées sur l'utilisation de levures, car très facile à manipuler, dans le but de découvrir de nouveaux acteurs moléculaires. A ce jour plus d'une quarantaine de gènes associés à l'autophagie ont été décrits (*autophagy-related genes* (ATG)) ayant pour la majorité un équivalent chez les mammifères (205).

L'autophagie peut être séparée en trois types différents : la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperons.

La macro-autophagie peut être sélective ou non, la sélection se faisant par la fixation d'ubiquitines ou des galectines sur les cibles de dégradation qui seront reconnues par des récepteurs spécifiques (206). Ces cibles peuvent être des organites, des virus, des pathogènes ou des agrégats protéiques qui seront incorporées dans une vésicule à double membrane lipidique nommée autophagosome. Ce dernier est formé en quatre étapes via des mécanismes faisant intervenir différents acteurs que nous détaillerons plus loin. Une fois sous sa forme mature, l'autophagosome va fusionner avec le lysosome, possédant un pH très faible et différentes enzymes, permettant la dégradation des composés incorporés. Cette fusion mène à la formation d'une nouvelle structure appelée autolysosome ou autophagolysosome (207).

La micro-autophagie consiste à incorporer la cible cytosolique de dégradation directement dans le lysosome sans intervention d'autophagosomes, et peut également se réaliser de manière sélective ou non. Cette forme d'autophagie peut permettre notamment la dégradation sélective d'organites cellulaires comme les péroxysomes (micropexophagie) (208), les mitochondries (micromitophagie) (209), le noyau (210), le RE (micro-RE-phagie) (211) ou encore la dégradation de lipides (microlipophagie) (212).

L'autophagie médiée par les protéines chaperons, comme son nom l'indique, demande l'intervention de protéines de ce type, comme celles de la famille Hsp70 dans le but de cibler

les protéines à dégrader dans le cytosol. Une fois ce complexe formé, les protéines chaperons vont interagir avec un composant de la membrane des lysosomes nommé LAMP-2 ce qui va finalement mener à la dégradation de la protéine cible (213).

De manière générale dans la littérature, le terme autophagie ramène directement au processus de macro-autophagie car il a été beaucoup plus étudié pendant ces dernières années par rapport aux autres. C'est spécifiquement ce type d'autophagie qui nous intéresse ici. Ainsi, dans la suite de ce manuscrit, le terme autophagie fera référence à la macro-autophagie. De plus, comme les acteurs moléculaires décrits chez les levures possèdent leurs homologues chez les mammifères pour lesquels certains ont un nom différent, nous utiliserons la nomenclature retrouvée chez les mammifères après avoir spécifié leur nom utilisé chez la levure.

B. Processus de formation des autophagosomes

1. Initiation

L'initiation de l'autophagie est régulée par le complexe 1 de mTOR (mTORC1). mTORC1 est une sérine/thréonine protéine kinase impliqué dans de très nombreux processus biologiques. Ce complexe est inactivé lors de la mise en place de différentes conditions, notamment la privation en nutriments, participant au déclenchement de l'autophagie. Son rôle est de phosphoryler les protéines *Unc-51-like kinase 1* (ULK1) (ATG1 chez la levure) et ATG13 du complexe ULK1. Le complexe ULK1 est également composé de la *focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa* (FIP200) (remplissant le rôle de Atg11 et Atg17 chez la levure (214)) et de ATG101. La phosphorylation de ULK1 et ATG13 a une fonction inhibitrice

en empêchant le complexe ULK1 de se former, et ainsi d'inhiber l'induction de l'autophagie (Figure 21).

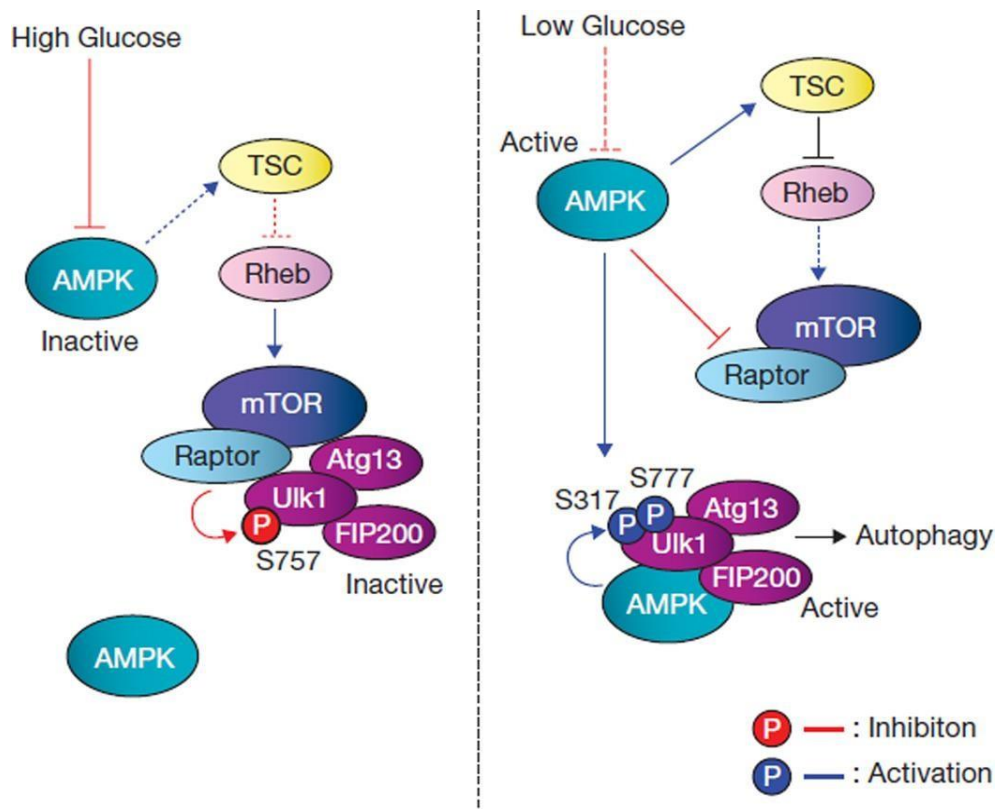


Figure 21 : Schéma représentatif des acteurs moléculaires impliqués dans la régulation de l'activation du complexe ULK1. (Kim et al, 2011)

mTORC1 est lui-même inhibé par l'AMP kinase (AMPK) qui s'active notamment lors de la diminution de la concentration de glucose dans la cellule. Après l'inhibition de mTORC1, ATG13 déphosphorylé peut se fixer de manière stable à ULK1, et recrutant ainsi rapidement les deux derniers composants du complexe, FIP200 et ATG101. De plus, l'AMPK peut se fixer sur ULK1 et le phosphoryler permettant ainsi d'aider à la formation du complexe ULK1 (Figure 21). L'intervention de l'AMPK à ce niveau n'est pas obligatoire pour l'activation du complexe ULK1. En effet, il a été montré que l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine, la principale molécule inhibitrice de mTORC1 connue, ou par la déplétion en acide aminé permettait la formation de ce complexe sans pour autant activer l'AMPK (215).

Finalement une fois l'initiation enclenchée, les étapes de nucléation et d'élongation de la membrane du phagophore vont pouvoir débuter, le terme phagophore désignant une forme précoce de l'autophagosome.

2. Nucléation et élongation

a. Lieu de formation des phagophores

L'élongation de la membrane du phagophore est un processus complexe, faisant intervenir de nombreux acteurs différents à des étapes spécifiques. Tout ce mécanisme prend place dans un lieu nommé *pre-autophagosomal structure* ou *phagophore assembly site* (PAS). Ce terme

désigne le lieu de début de formation d'une structure lipidique, par courbure de la membrane donneuse, sur laquelle vont être recrutés les différents acteurs moléculaires qui permettront l'expansion et la maturation du phagophore (216).

Contrairement à ce qui a été décrit chez la levure jusqu'à ce jour, la localisation cellulaire exacte des PAS chez les cellules de mammifères n'est pas tout à fait définie et reste encore sujet à débat. Quelques modèles ont décrit que les membranes du RE, des vésicules COPII, des endosomes, des gouttelettes lipidiques, des mitochondries ou encore de la membrane plasmique pourraient être des sources de lipides permettant l'élongation du phagophore (207). Aucun de ces modèles n'exclut un autre en soit, certains peuvent notamment interagir ensemble. Par exemple, des études ont montré que l'inhibition d'une protéine impliquée dans le contact entre RE et mitochondries menait à une diminution du recrutement de facteurs clés dans la formation des phagophores (217,218). Un autre modèle, décrit dans une étude récente, atteste d'une structure hybride qui est formée suite à l'intervention de composés de la voie conventionnelle de sécrétion et d'acteurs impliqués dans le système endosomal (219). Cependant pour certains modèles, ces hypothèses sont issues d'observations basées sur ce qui a été décrit chez les levures, mais qui pourrait être transposés à des mécanismes retrouvés chez les mammifères.

Un fait faisant cependant consensus est qu'au niveau des PAS, la membrane lipidique va se déformer pour donner une première ébauche de structure isolée en forme de « oméga ». Cette structure nommée l'omégasome marque la fin de l'étape de nucléation, et les divers acteurs moléculaires, qui permettront l'élongation de la membrane du phagophore, vont pouvoir y être recrutés (220).

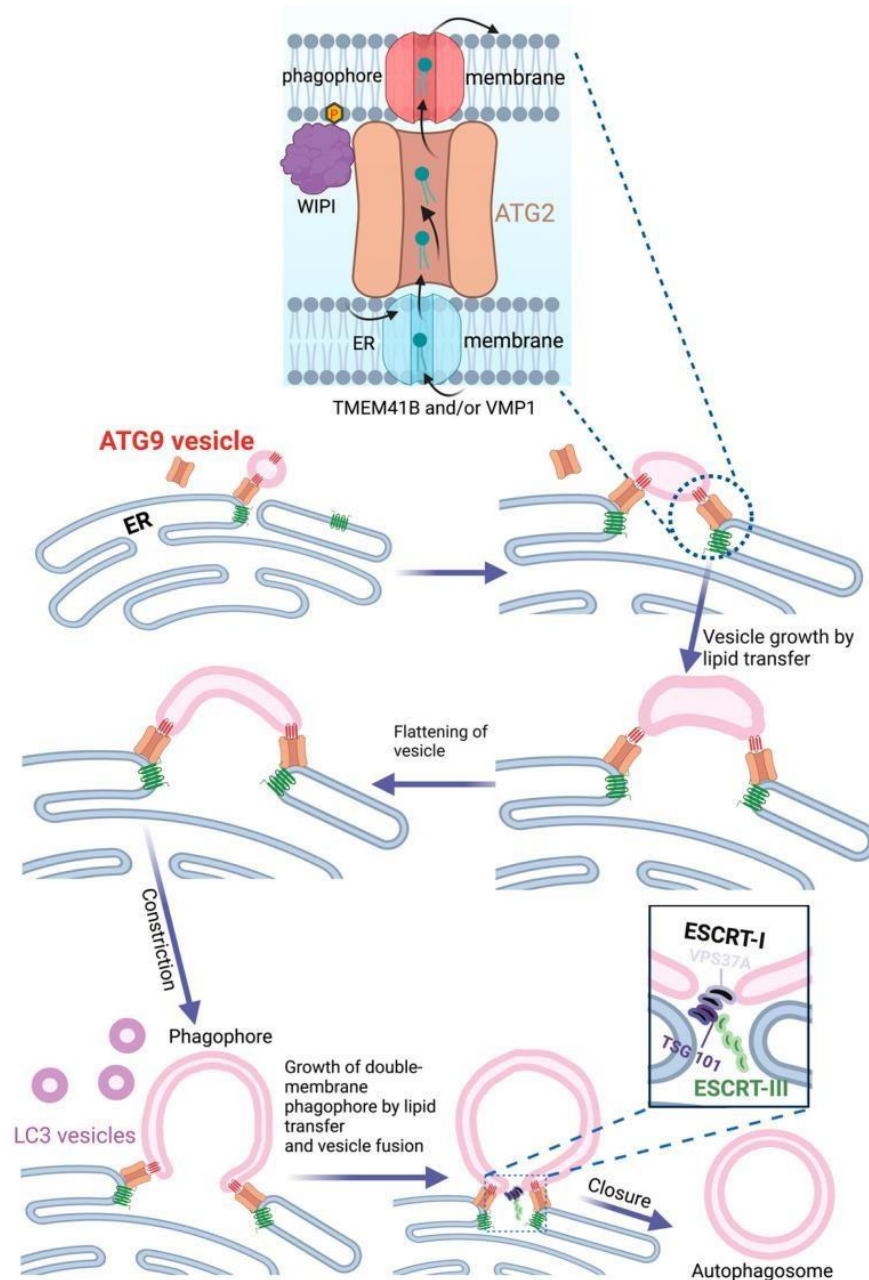


Figure 22 : Représentation schématique du processus d'élongation de la membrane d'un autophagosome au niveau du RE. (Y. Zhen and H. Stenmark, 2023)

ATG2 interagit avec TMEM41B et VMP1 au niveau du RE et permet la fixation d'une vésicule lipidique contenant ATG9. ATG2 permet le transfert de lipides nouvellement synthétisés dans le RE vers la vésicule, ce qui a pour conséquence d'augmenter sa taille. ATG9 permet de contrôler l'arrangement des lipides dans la membrane du phagophore en cours de formation grâce à sa fonction de scramblase jusqu'à la fermeture.

Malgré le manque de certitude sur le lieu de formation des PAS, il est admis que le RE a un rôle prépondérant dans la formation de ces structures lipidiques. Les deux protéines centrales

pour apporter les lipides constituant la membrane du phagophore sont : ATG2 qui est un canal permettant le passage de lipides (221) et ATG9 qui est une scramblase qui permet la translocation de phospholipides au travers de la bicouche lipidique (Figure 22) (222). ATG9 permettrait d'amener une base de structure lipidique via les vésicules qui le transporte jusqu'au PAS, notamment par l'apport de phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) (223). Ces vésicules peuvent être issues de plusieurs sources (Figure 23) (224). ATG2 sert de pont entre la membrane du RE et la membrane du phagophore. Elle permet le passage de lipides nouvellement synthétisés dans le RE qui sont ensuite réarrangés par ATG9 lors de leur arrivée au niveau de la membrane du phagophore (Figure 22). Cela est possible via l'association de ATG2 avec ATG9 et avec la *WD-repeat domain phosphoinositide-interacting protein* (WIPI) 4, qui fait partie d'une famille de protéines importante dans la formation des autophagosomes, avec l'intervention d'autres acteurs présents à la membrane du RE (Figure 22) (225,226).

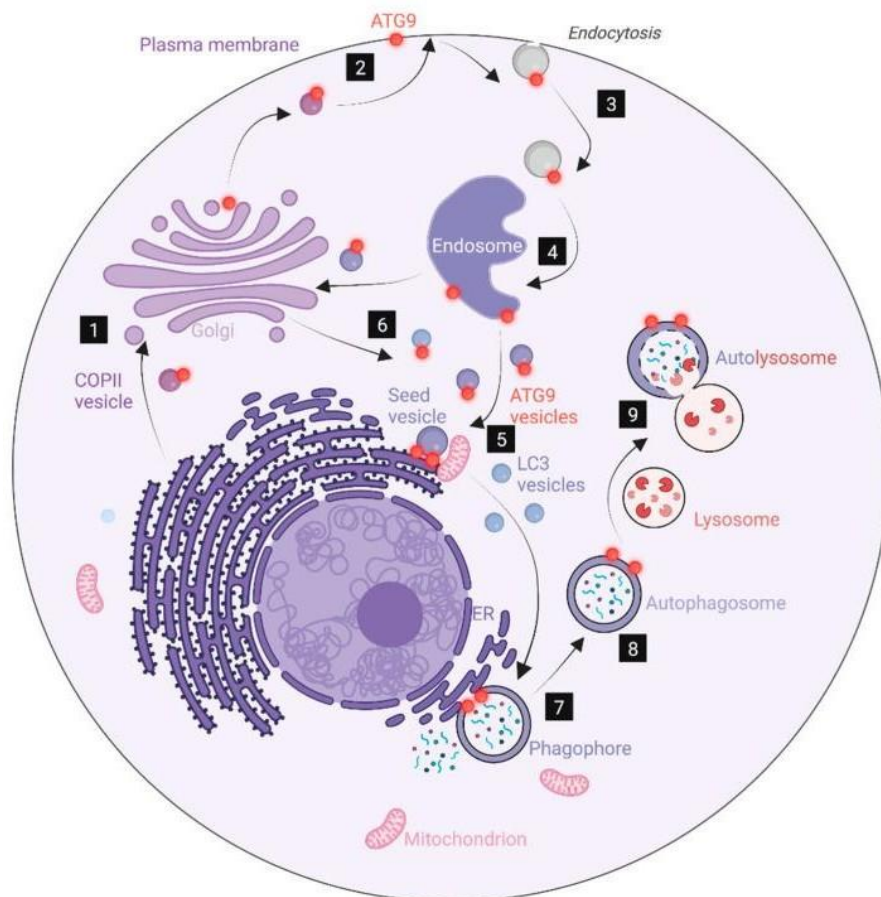


Figure 23 : Schéma représentant le trajet et les différents lieux d'origine des vésicules contenant ATG9 dans la cellule. (Y. Zhen and H. Stenmark, 2023)

Les acteurs principaux qui vont rejoindre les PAS après le début de sa formation sont le complexe phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) de classe III (PI3KC3) et la protéine *microtubule-binding protein-1 light-chain-3* (LC3) (Atg8 chez la levure). Ces deux acteurs s'activent par des mécanismes différents mais de manière concomitante. Commençons par décrire l'implication du complexe PI3KC3.

b. Complexe PI3KC3

Il existe trois classes de complexes de PI3K chez les eucaryotes qui sont impliqués dans un large panel de mécanismes cellulaires, via notamment la phosphorylation de diverses formes de phosphatidylinositol (227). La classe qui nous intéresse tout particulièrement est la classe III qui permet d'obtenir la formation de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P), un phospholipide essentiel dans la structuration de la membrane des phagophores.

PI3KC3 fait partie de la famille des kinase PI3K qui permettent la phosphorylation de groupe hydroxyle sur des phosphoinositides. Chaque classe de PI3K a des phosphoinositides cibles spécifiques.

PI3KC3 est elle-même divisée en deux complexes composés de trois acteurs moléculaires : la Beclin-1 (Atg6 chez la levure), *vacuolar protein sorting* (Vps) 34 et Vps15. La différence entre les deux complexes de PI3KC3 vient de la fixation d'un dernier intervenant qui va changer leur localisation cellulaire et donc leurs effets. Le premier complexe est complété par la fixation de ATG14 et permet d'aider à localiser PI3KC3 au niveau des PAS. La formation du deuxième complexe est liée à la fixation de UVRAG1 ce qui va permettre de réguler l'endocytose (228). Même si le deuxième complexe pourrait avoir un rôle dans l'autophagie, notamment via le recyclage d'acteurs moléculaires, nous simplifierons ici en ne décrivant que l'implication du premier complexe.

Concernant le complexe qui nous intéresse : Vps34 correspond à la sous-unité catalytique, Vps15 est une sous-unité régulatrice concernant son activité et ATG14 permet la localisation du complexe au niveau des PAS (228). La Beclin-1 est également un acteur central de ce complexe.

La Beclin-1 est associée à un niveau basal à la protéine Bcl-2. Le recrutement du complexe ULK1 sur les PI4P (229) induit la phosphorylation de la Beclin-1, sa dissociation de Bcl-2 et donc la formation du complexe PI3KC3 (230,231). Au niveau du phagophore, PI3KC3 permet de catalyser la formation de PI3P à partir des PI4P, qui ont été amenés au préalable par les vésicules contenant ATG9 (232). Une fois que la production de ce phospholipide a débuté, d'autres acteurs moléculaires vont venir se fixer et vont eux aussi jouer un rôle dans la formation et la maturation de l'autophagosome. WIPI2 en fait partie, il va permettre l'ancrage de LC3 dans la membrane de l'autophagosome (233) dont nous allons décrire le processus d'activation.

c. LC3

LC3 est une protéine faisant partie de la famille des ATG8 chez les mammifères. Sept ATG8 existent dont quatre types de LC3 (LC3A variants 1 et 2, LC3B et LC3C) et trois types de *GABA type A receptor-associated protein* (GABARAP) (GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2). Ces ATG8 possèdent une région particulière dans leur séquence nommée *LC3-interacting region* (LIR) qui permet de recruter, par exemple, des protéines cargo. Globalement, il fait consensus que les LC3 permettent l'élongation du phagophore et de faire le lien entre des transporteurs et des protéines à transporter. Tandis que les GABARAPs sont davantage impliqués dans des étapes tardives de la maturation de l'autophagosome comme sa fermeture et sa fusion avec les lysosomes (234). Ce ne sont que des généralités, car tous leurs effets n'ont pas encore été décrits, étant donné que la fonction ainsi que la localisation des différents ATG8 varient beaucoup d'un acteur à l'autre (235,236).

Le mécanisme d'activation des différents LC3 et GABARAP passe par l'association de phosphatidyléthanolamine (PE) au niveau de leur glycine en position C-terminale de leur séquence polypeptidique. Pour arriver à ce stade, les ATG8 vont subir des modifications par l'intervention de différents ATG, qui sont en réalité des protéines E1/E2/E3 « ubiquitine-like » (Figure 24).

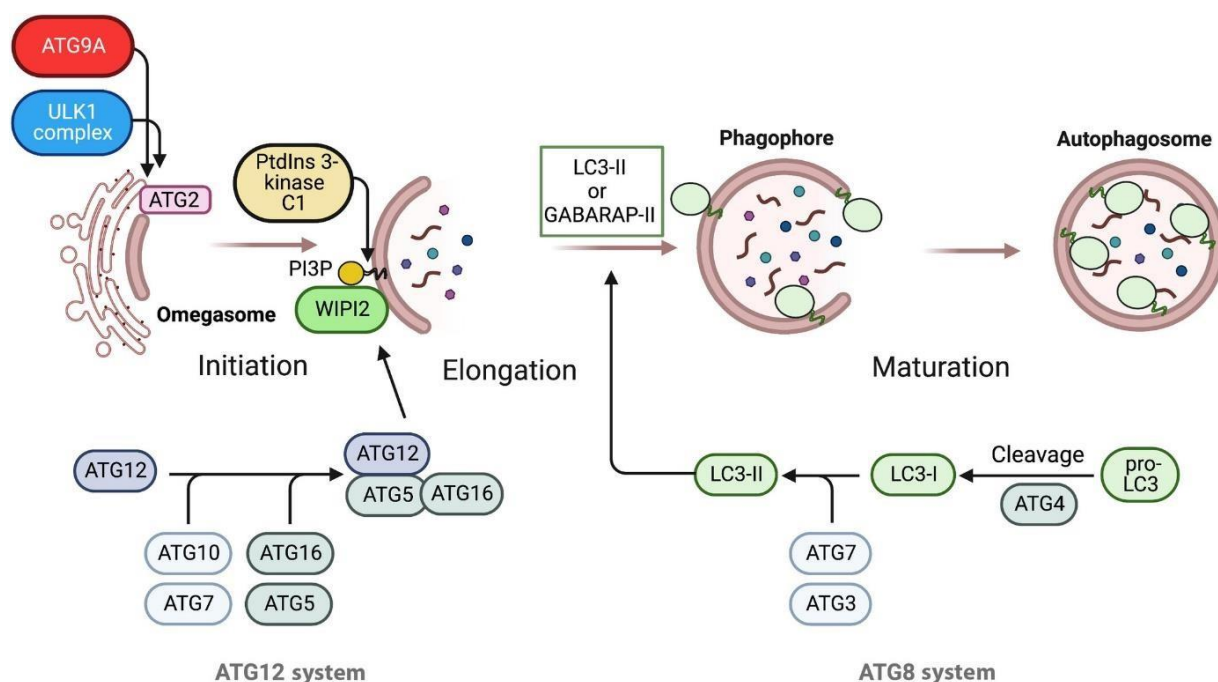


Figure 24 : Représentation schématique des processus d'activation des ATG8 et du complexe ATG12-ATG5-ATG16. (Tooze et al., 2023)

A gauche l'activation du complexe ATG12-ATG5-ATG16. ATG12 est tout d'abord fixé sur ATG7 ce qui mène au transfert de ATG12 vers ATG10. Puis ATG10 transfère ATG12 sur le complexe ATG5-ATG16 formé au préalable. Le complexe ATG12-ATG5-ATG16 migre ensuite jusqu'aux PAS et se fixe à la membrane du phagophore grâce à l'interaction avec WIPI2.

À droite les étapes menant à la lipidylation de ATG8, ici en prenant l'exemple de LC3. LC3 est d'abord retrouvée sous sa forme précurseur en tant que pro-LC3. ATG4 vient cliver une cystéine en C-terminale permettant de révéler une glycine induisant la formation de LC3-I, correspondant à sa forme cytosolique. LC3 se lie à ATG7 puis est transféré sur ATG3. Cette fixation mène à la relocalisation de LC3 au niveau des PAS où elle va pouvoir interagir avec le complexe ATG12-ATG5-ATG16 pour se lier à un PE au niveau de la membrane du phagophore.

Tout débute avec l'action de la cystéine protéase ATG4, qui permet de découvrir un résidu de glycine en position C-terminale des pro-ATG8. Cette modification permet d'obtenir une forme active et cytosolique nommée ATG8-I (237). De manière ATP-dépendant, les ATG8-I vont s'associer avec ATG7, une protéine E1 « ubiquitine-like » puis sont transférées vers une E2 « ubiquitine-like » nommée ATG3. Le complexe ATG8-ATG3 est alors formé (Figure 24).

En parallèle se forme le complexe E3 « ubiquitine-like » ATG12-ATG5-ATG16. Il va permettre d'aider à associer le complexe ATG8-ATG3 à la membrane du phagophore. Le même type de processus faisant intervenir des protéines E1/E2/E3 « ubiquitine-like » permet la formation de ce complexe. ATG12 est activé par sa fixation à ATG7, puis ATG12 est transféré vers ATG10. Ensuite, ATG10 donne lieu à la formation d'une liaison covalente entre les extrémités C-terminale de ATG5 et ATG12 (237). Une liaison se crée également entre ATG5 et ATG16 ce qui va permettre le bon adressage du complexe ATG12-ATG5-ATG16 jusqu'au PAS en s'associant avec WIPI2 (238). Ceci finalisé, ATG3 interagit avec ATG12 se qui catalyse la lipidation de ATG8-I sur un PE, formant ATG8-II. Ce dernier est ensuite recruté au niveau de la membrane du phagophore pour participer à son élongation (Figure 24).

3. Fermeture

Le phénomène de fermeture des phagophores reste encore aujourd'hui sûrement l'étape la moins connue de l'autophagie. La raison à cela est qu'un très grand nombre d'acteurs entrent en jeu, et semblent impliqués aussi bien dans la régulation de l'élongation que dans la fermeture, rendant difficile d'établir une distinction claire entre ces deux étapes.

C'est notamment le cas de plusieurs ATG, comme par exemple des précédemment mentionnés GABARAPs qui semblent être davantage nécessaires à la fermeture des phagophores (234). Malgré cela, quelques avancées récentes ont permis d'identifier certains acteurs. Parmi eux, les *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT), des protéines SNAREs, des rab GTPase, les sphingomyélines ou encore les ions calcium. Pour ces derniers, leurs effets ne sont pas encore bien compris. D'abord parce que ce sont des ions impliqués dans de nombreux processus biologique (239). Ensuite parce que des études ont montré que le calcium peut engendrer des réponses opposées dans la régulation de l'autophagie (240,241).

Concernant le mécanisme global, les complexes ESCRTs semblent être des acteurs centraux dans la fermeture du phagophore. Les ESCRTs peuvent être classés en cinq groupes : ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III et ESCRT-associated proteins. Ils sont retrouvés dans certains processus cellulaires comme le développement neuronal, la réparation de la membrane plasmique, le voie endosomale ou encore l'autophagie dans notre cas (242). ESCRT-III est recruté au niveau du phagosome, via l'intervention des autres complexes ESCRTs et également par l'intervention du complexe ULK1. Son transport jusqu'au PAS est dépendant de l'intervention de la GTPase Rab5 (242,243). Après son transport vers le site de fermeture, ESCRT-III va servir de pont permettant de rapprocher les extrémités membranaires du phagophore en fin d'élongation. Par l'action de diverses protéines SNAREs et Rabs, la fermeture finale peut ainsi se réaliser (Figure 25) (207,239).

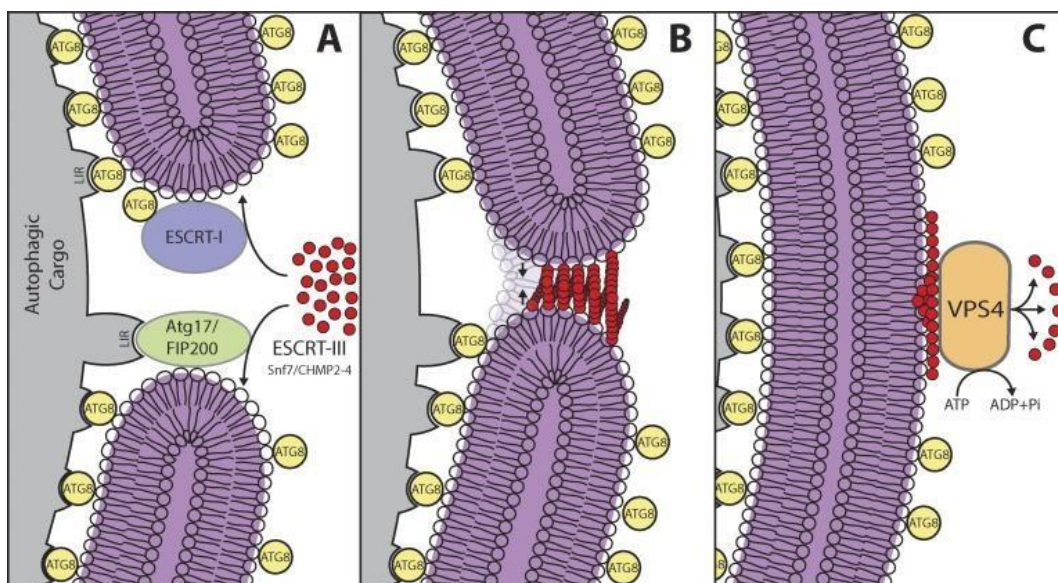


Figure 25 : Schéma représentant l'action du complexe ESCRT-III lors de la fermeture de la membrane du phagophore. (Modifié de Melia et al., 2020)

Après leur recrutement au niveau du site de fermeture du phagophore (A), ESCRT-III se polymérise et permet de créer un pont entre les deux extrémités membranaires (B). Vps4 permet, par son action ATP-dépendante, de réaliser la fusion des deux membranes et de dépolymériser ESCRT-III (C).

4. Fusion

Le but premièrement décrit pour le processus de l'autophagie est sa capacité à dégrader des composants cellulaires afin de recycler et de réutiliser ce matériel biologique. Ce processus a lieu lors de la maturation de l'autophagosome quand celui-ci fusionne avec des endosomes, précoces ou matures donnant une structure appelée amphisome, ou avec des lysosomes, permettant la formation d'un autolysosome (244). Il est possible qu'un amphisome fusionne avec un autolysosome et il était d'ailleurs pensé il y a quelques années que cette étape était inévitable pour permettre la dégradation du contenu cible (245).

Les principaux effecteurs impliqués dans la fusion entre autophagosome et endosome et/ou lysosome sont principalement des protéines faisant partie des familles des Rab GTPase (Rab7) et des SNAREs (Syntaxine 17) (Figure 26). Ces protéines promeuvent la fusion des

membranes après qu'un rapprochement des deux corps a été fait grâce à l'intervention des ATG8, GRASP55 et LAMP-2, dont l'interaction sert de pont entre les entités à fusionner (246).

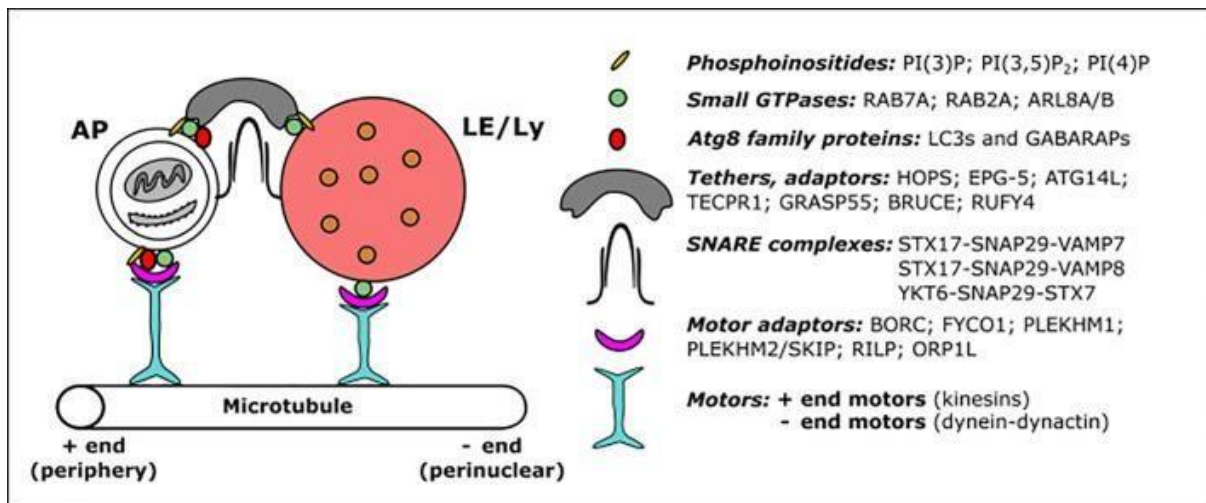


Figure 26 : Schéma représentant la fusion entre un autophagosome (AP) à gauche et un endosome tardif (LE) ou un lysosome (Ly) à droite, ainsi que les différents acteurs entrant en jeu dans ce phénomène. (P. Lőrincz and G. Juhász, 2020)

De plus, une étude a montré que l'acidification du lysosome est un phénomène non nécessaire pour la fusion de cette vésicule avec un autophagosome (247). Ce fait est intéressant car cela suppose que le contenu des autophagosomes n'est pas forcément voué à être dégradé. En effet, il a été souligné depuis quelques années que le processus d'autophagie était impliqué dans le transport dépendant de l'UPS pour des protéines sans séquence d'adressage au RE (dites « leaderless ») ou transmembranaires mutées (248). La difficulté à ce jour est de déterminer le moment où l'autophagie prend un rôle dégradateur ou sécrétoire, notamment en identifiant et en dénombrant les divers acteurs impliqués dans ce processus, ainsi que de clarifier leur cinétique de participation.

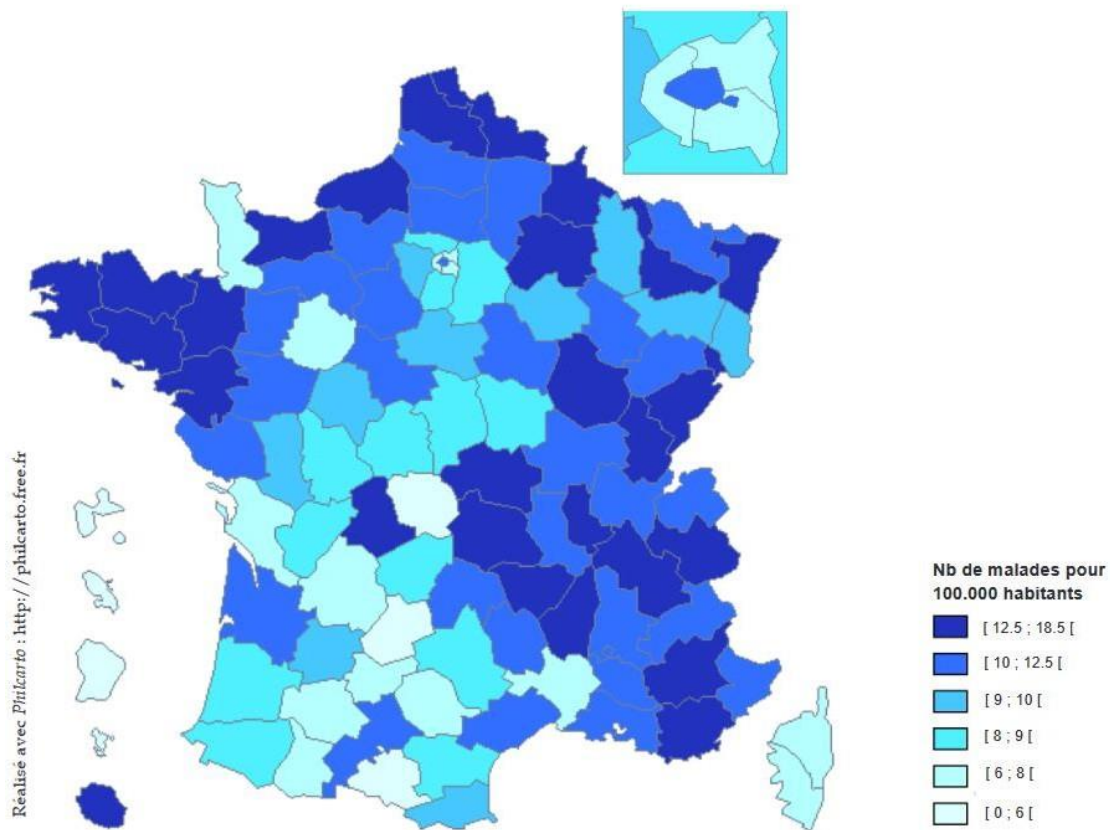
C'est cette particularité dans le processus d'autophagie qui m'a intéressé lors de mon projet de thèse. Travaillant sur le modèle pathologique de la mucoviscidose, le gène *cftr* est l'acteur central car il est altéré par les diverses mutations caractéristiques de cette maladie. Le contexte de la mucoviscidose sera tout d'abord abordé. Puis, une fois vous avoir présenté en détail la protéine CFTR, ainsi que la mutation majoritairement retrouvée, nous aborderons la relation entre le phénomène d'UPS et le transport de cette protéine sous sa forme mutée.

IV. La mucoviscidose

A. Généralités

La mucoviscidose (Cystic fibrosis en anglais) est la maladie génétique létale à transmission autosomale récessive la plus retrouvée dans la population européenne. Le nombre de personnes atteintes par cette pathologie varie beaucoup en fonction de la situation géographique, cela étant dû notamment aux mouvements de population au cours de l'Histoire. Par exemple, en Australie l'incidence est estimée à 1/3000. Aux Etats-Unis ainsi qu'au Canada,

zone géographique où une grande variété génétique dans la population existe, l'incidence est estimée respectivement à 1/4000 et 1/3300. En Europe de grandes variations sont également observées. L'incidence est estimée de 1/6000 en Europe Centrale et du Nord alors qu'elle est de 1/4500 en Europe de l'Ouest. Par ailleurs, il y a des variations entre certains pays, en Irlande l'incidence était estimée à 1/1353 en 2007 alors qu'en Finlande elle était de 1/25000 en 2008 (249). Au sein d'un même pays, il peut y avoir également une grande diversité, c'est le cas de la France avec une grande variation dans la distribution des malades en fonction du département de résidence (Figure 27). L'incidence moyenne y est de 1/4500 mais fluctue par exemple entre 1/3000 en Bretagne et 1/7000 en Île-de-France (250).



Registre français de la mucoviscidose 2022

Figure 27 : Prévalence de la mucoviscidose en France selon le département de résidence. (Version modifiée du registre français de la mucoviscidose 2022)

Aux Etats-Unis, 40.000 personnes ont été recensées comme atteinte de la mucoviscidose (<https://www.cff.org/intro-cf/about-cystic-fibrosis>) tandis qu'en France nous comptons, en 2022, environ 7500 patients (<https://www.vaincrelamuco.org/>). Dans le monde, le nombre de personnes touchées est estimé à plus de 150.000 personnes.

Mutations	Nombre de patients *	Proportion (en%)
F508del	6297	83.2
G542X	415	5.5
N1303K	322	4.3
2789+5G>A	198	2.6
1717-1G>A	162	2.1
G551D	133	1.8
R117H	133	1.8
R553X	126	1.7
W1282X	116	1.5
L206W	114	1.5
3849+10kbC>T	110	1.5
I507del	95	1.3
3272-26A>G	90	1.2
D1152H	89	1.2
711+1G>T	84	1.1
Y122X	78	1.0
2183AA>G	73	1.0
R347P	73	1.0
3120+1G>A	66	0.9
R1162X	60	0.8
R334W	55	0.7
Y1092X	54	0.7
A455E	53	0.7
G85E	53	0.7
R347H	53	0.7
3659delC	48	0.6
1078delT	45	0.6
S945L	45	0.6
1811+1.6kbA>G	36	0.5
394delTT	36	0.5
621+1G>T	34	0.4
E60X	34	0.4
R1066C	33	0.4
W846X	33	0.4
1677delTA	28	0.4
E585X	26	0.3
L997F	26	0.3
S1251N	25	0.3
Q220X	24	0.3
G576A	22	0.3

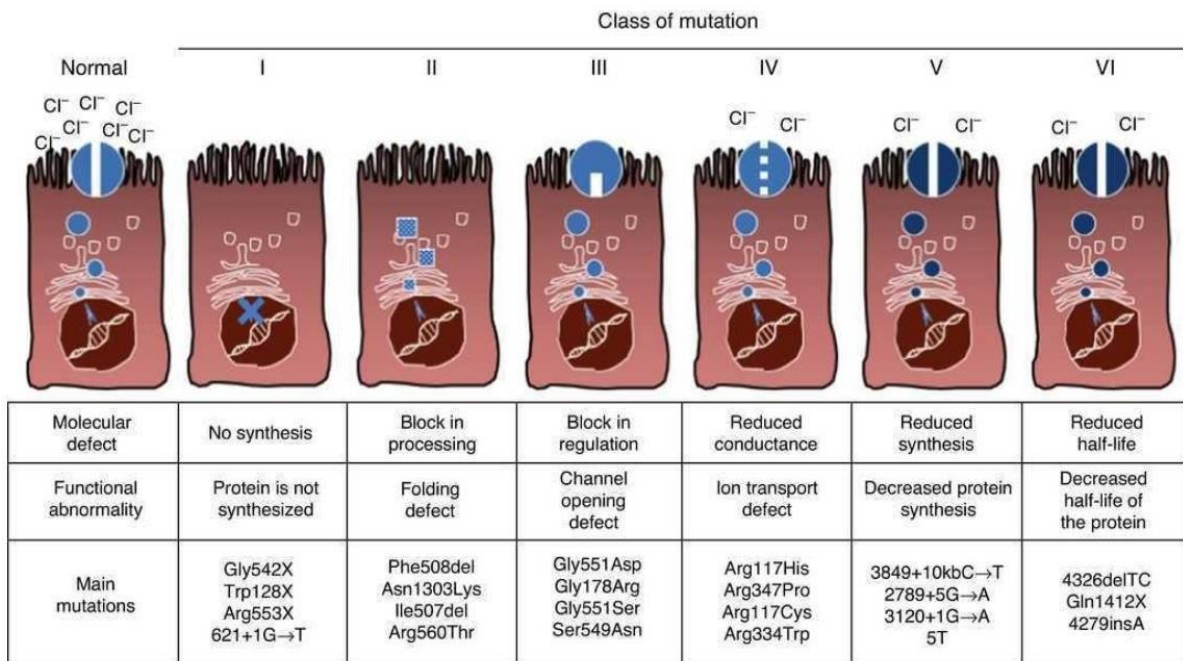
Registre français de la mucoviscidose 2022

Figure 28 : Liste des quarante mutations les plus fréquemment retrouvées chez les patients français atteints de mucoviscidose. (Registre français de la mucoviscidose 2022)

Historiquement, la mucoviscidose a commencé à être décrite au Moyen-Age même si certaines estimations font penser que cette maladie est beaucoup plus ancienne que cela (251). A l'époque du Moyen-Age, cette maladie était plus reliée à la malédiction dite du « baiser salé » (252). Les enfants touchés par cette maladie étaient « dépistés » lorsqu'ils étaient embrassés sur leur front et que leur sueur avait un goût salé à cause d'un excès de sel dans la transpiration. L'explication de cette particularité a débuté en 1953 (253), ce qui a permis le développement du « test de la sueur » qui a pendant longtemps été le test de dépistage principal (254). Une étude a mis en évidence qu'une fuite de Cl⁻ avait lieu au niveau des cellules sudoripares des patients (255). Avec une deuxième étude, qui a montré que cette particularité était causée par une rétention d'ions sodium (256), ce sont les premiers pas qui ont été effectués vers l'explication de la cause de cette maladie, c'est-à-dire un défaut de transport et d'échange d'ions au sein des cellules de l'individu.

Il faudra attendre 1985 pour obtenir une avancée déterminante sur la compréhension de la mucoviscidose avec la découverte du gène *cftr*. Ce gène est localisé sur le bras long du chromosome 7 (locus 7q31.2) et est composé de 27 exons répartis sur 250 kilobases (257,258). En 1989, une série d'articles finit de poser les bases pour comprendre l'origine moléculaire de la mucoviscidose. Ils décrivent leurs avancées sur le clonage du gène *cftr*, et sur la description de la mutation la plus répandue chez les patients atteints de cette pathologie (259–261). Cette mutation est caractérisée par la délétion d'une phénylalanine (Phe) en position 508 de la séquence polypeptidique de la protéine CFTR, la protéine mutée est alors nommée p.Phe508del-CFTR. Bien que cette mutation soit la plus fréquente (présente dans 80% des allèles mutés), elle est loin d'être la seule existante puisque, à ce jour, 2117 mutations ont été recensées et ce nombre augmente régulièrement (Figure 28) (cystic Fibrosis Mutation Database). Ces différentes mutations ont été catégorisées en six classes différentes en fonction de leurs effets sur la protéine (Figure 29). La première classe concerne les mutations conduisant à une absence de la protéine CFTR dans les cellules. La deuxième classe regroupe les mutations amenant à la production d'une protéine mal repliée, ce qui implique un transport intracellulaire du CFTR moins efficace. La troisième classe catégorise les mutations rendant la protéine CFTR incapable de fixer les molécules d'ATP, empêchant l'ouverture du canal. Les mutations de la quatrième classe altèrent la structure des segments transmembranaires, ce qui rend les efflux d'ions moins efficaces par rapport à la protéine CFTR non mutée. La classe 5 rassemble les mutations altérant la stabilité de l'ARNm CFTR et donc diminue la quantité de protéine synthétisée. Enfin les mutations de classe 6 mènent à une perte de stabilité de la protéine CFTR

mature à la membrane, la rendant alors plus à même d'être dégradée par des processus de recyclage cellulaire (Figure 29).



Arch Bronconeumol 2014;50:146-50

Figure 29 : Schéma représentant les différentes classes de mutation et leurs effets sur la protéine CFTR, la représentation de gauche correspondant à une cellule saine. (Quintana-Gallego et al., 2014)

B. CFTR

1. Structure et activation

La protéine CFTR est composée de 1480 acides aminés, et est un canal ionique faisant parti de la famille des transporteurs *ATP-binding cassette*, qui nécessite l'hydrolyse d'ATP pour son fonctionnement. Le CFTR dispose de deux domaines transmembranaires (*transmembrane domains* en anglais : TMD), deux NBD permettant la fixation et l'hydrolyse d'ATP et un domaine régulateur (*regulatory domain* en anglais : RD) situé entre le TMD2 et le NBD1 (262) (Figure 30). De plus, il a été mis en évidence par électrophorèse que le CFTR peut être retrouvé sous différentes formes (263). La première forme appelée bande A (environ 130 kDa) correspond à la forme immature du CFTR, la deuxième est nommée bande B (environ 135 kDa) correspondant à une forme partiellement glycosylée et donc partiellement mature (*core-glycosylated* en anglais) et la troisième est appelée bande C (environ 150 kDa) et correspond à sa forme totalement mature (264). Ces trois formes reflètent le CFTR à différentes étapes de sa formation, en sachant que la bande B est régulièrement rapprochée de la forme mutée du CFTR dans la littérature, notamment dans le cas de la p.Phe508del-CFTR. Le CFTR a également la particularité d'avoir un domaine PDZ situé à son extrémité C-terminale. Ce domaine est retrouvé dans de nombreuses protéines impliquées dans divers rôles cellulaires, comme des canaux ioniques ou des récepteurs (265). Ce domaine PDZ permet notamment au CFTR d'interagir avec GRASP55 et d'être transporté à la membrane par le mécanisme d'UPS, dont nous détaillerons le processus un peu plus loin (266).

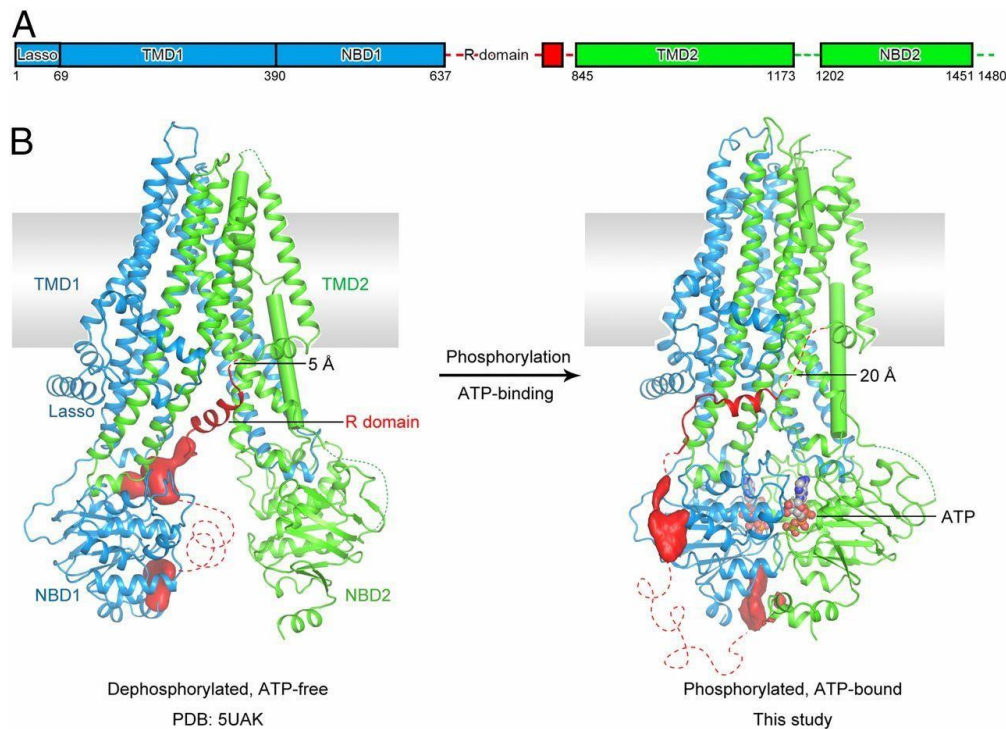


Figure 30 : Représentation de la structure primaire (A) et de la structure tridimensionnelle (B) du canal CFTR. (Z. Zhang and J. Chen, 2018)

Les deux TMDs, constitués chacun de six hélices α hydrophobes reliées par des boucles extracellulaires, sont ancrés dans la membrane plasmique et forment le pore du canal qui permet

le passage des ions (267).

Les NBDs quant à eux sont cytosoliques, tout comme les extrémités N- et C-terminales du CFTR. Les deux NBDs sont composés de deux sous-domaines, un composé de d'hélice α et un autre qui sert de site catalytique qui va présenter les motifs de Walker permettant la fixation des molécules d'ATP et d'ions magnésium, ces derniers faisant office de co-facteurs catalytiques (268). Les deux NBDs ne sont cependant pas tout à fait identiques. En effet, ils présentent quelques variations d'acides aminés dans leurs séquences polypeptidiques, faisant que seul le domaine NBD2 hydrolyse l'ATP. NBD1, même s'il n'hydrolyse pas d'ATP, fixe cette molécule et participe à l'ouverture du canal en stabilisant la conformation entre les deux NBDs (269).

Le RD de son côté a une structure désordonnée dont les multiples sites de phosphorylation vont modifier la conformation de ce domaine, et donc ses interactions avec les autres, permettant la fermeture ou non du pore ionique. En effet, la phosphorylation du RD par les protéines kinases A et C va faciliter la fixation de l'ATP aux NBDs. Une fois cela fait, les deux NBDs vont se dimériser conduisant à une modification de la conformation tridimensionnelle des TMDs, permettant le passage des ions. Une fois hydrolysés en ADP, les domaines NBDs sont dissociés, ramenant les TMDs à leur conformation initiale et refermant le canal CFTR (270).

2. Synthèse et maturation

Le CFTR est une protéine transmembranaire de type IV-A synthétisée comme précédemment décrit dans ce manuscrit (Figure 4). Sa synthèse complète s'effectue en environ 9 minutes (271).

Sa synthèse débute par le domaine TMD1 composé de six TMs (272). L'insertion de ces domaines se réalise par pair, ainsi le TM1 se lie à la SRP grâce à son peptide signal ce qui permet son insertion dans le pore de translocation Sec61 suivi du TM2. Il arrive régulièrement que le TM1 n'arrive pas à initier ce processus. C'est donc le TM2, lui-même composé d'un peptide signal, qui est transloqué en premier dans le pore Sec61 permettant d'insérer par la suite ces deux TMs dans la membrane (273). Ce mécanisme se répète pour les couples TM3/TM4 et TM5/TM6. Une fois cela réalisé, la traduction de TMD1 étant donc terminée, s'ensuit celle du domaine NBD1 puis du domaine R qui se replie de manière co-translationnelle. Les six TMs du domaine TMD2 sont ensuite insérés dans la membrane, et la traduction du CFTR se termine par la production du domaine NBD2 (274). Une fois ces étapes terminées, le CFTR subit une première étape de maturation par la glycosylation sur sa quatrième boucle extracellulaire située dans la lumière du RE. La bande B, de 135 kDa, du CFTR est alors obtenue (275).

Pendant ces étapes, le CFTR en cours de synthèse est pris en charge par des protéines chaperons afin de l'aider à acquérir sa structure tertiaire. Une fois le domaine NBD1 synthétisé, les chaperons Hsc70 et *Human DnaJ homolog 2* (faisant parties respectivement des familles Hsp70 et Hsp40) se fixent dessus afin de stabiliser ce domaine et de commencer son repliement

le temps que le domaine R soit synthétisé. Le domaine TMD2 est ensuite synthétisé et ancré dans la membrane du RE, ce qui permet la stabilisation de l'interaction entre les domaines NBD1 et R (276). C'est également à ce moment qu'intervient la CNX, permettant également de stabiliser les interactions inter-domaines (277,278).

Comme mentionné dans la première partie de ce manuscrit (cf Introduction I.B.2.b), le complexe CNX/CRT fait office de deuxième étape de contrôle qualité en reconnaissant la cupule glucidique qui est apportée pendant l'étape de N-glycosylation. Ce complexe joue un rôle important dans la stabilisation du domaine TMD2 du CFTR en cours de repliement (279), même si une étude a montré qu'il n'était pas central dans le « turnover » du CFTR dans la lumière du RE (280). Beaucoup d'autres protéines chaperons ont montré leur importance dans ces étapes de maturation. Parmi ces protéines, dont l'interaction directe avec le CFTR a été démontré, nous pouvons citer Grp78 et Grp75 qui interviennent très tôt pour aider au bon repliement du CFTR, mais aussi Hsp90 intervenant avec ses co-chaperons *activator of Hsp90 ATPase homologue* et *prostaglandin E synthase 3* (281).

La troisième étape est régulée par l'arginine-framed tripeptides qui peut reconnaître des motifs R/X/R. Le CFTR possède quatre motifs comme celui-ci situés au niveau de son extrémité N-terminale, son domaine NBD1 et R. Si pendant son repliement ces motifs ne sont pas cachés, le CFTR est retenu dans le RE et ne peut pas initier son transport jusqu'à l'appareil de Golgi (282).

La quatrième et dernière étape de contrôle qualité intervient lors de la prise en charge du CFTR par Sec24. Cette dernière est un composant majeur dans la constitution des vésicules COPII, et permet de reconnaître une séquence spécifique Asparagine/Alanine/Asparagine dans la séquence polypeptidique du CFTR. Si une telle séquence ne peut être reconnue par Sec24, le CFTR est dans l'incapacité de s'associer avec cette dernière et ne peut donc pas être transporté jusqu'à l'appareil de Golgi (282). Une fois toutes ces étapes validées, le CFTR est acheminé jusqu'à l'appareil de Golgi où il va pouvoir subir ses dernières étapes de maturation, permettant l'obtention d'un CFTR de 160 kDa également appelé bande C qui va pouvoir être transporté jusqu'à la membrane plasmique.

Malgré tous ces processus mis en place, il est estimé que, dans des cellules non polarisées, seulement 20 à 40% du CFTR produit fini ces étapes de repliements, le reste étant dégradé par l'ERAD (272). Cette proportion est modifiée dans le cas des cellules polarisées où le taux de CFTR correctement replié varie entre 60 et 100% (283).

Concernant la dégradation du CFTR via l'ERAD, deux étapes dans le système de contrôle qualité du RE peuvent y mener. La première étape fait intervenir Hsc70 qui est également impliquée dans la dégradation de protéines mal formées, et est associée à l'ubiquitine ligase CHIP, Fbs1 et RNF5 (49,284,285). Ces dernières permettent l'ubiquitinylation du CFTR pour qu'il soit dégradé par le protéasome 26S (286). La deuxième étape où le CFTR peut être amené à être dégradé se situe lors de l'intervention du complexe

CNX/CRT. Si les cycles de glycosylation/déglycosylation ne permettent pas d'obtenir une forme correctement repliée du CFTR, celui-ci est ubiquitinylé et acheminé jusqu'au protéasome 26S afin d'y être dégradé.

3. Fonctions

a. Canal ionique

Le canal CFTR est d'abord et avant tout un canal ionique permettant le transport d'anions vers l'extérieur de la cellule. Parmi les anions transportés nous pouvons citer les ions iodures, bromures, nitrates, bicarbonates, Cl^- , fluor ou d'autres composés comme les thiocyanates et le glutathion. La perméabilité du CFTR vis-à-vis de ces molécules étant thiocyanates > nitrate > brome > Cl^- > iode > bicarbonate > fluor (287,288). Mais les deux anions principalement étudiés dans la littérature sont les ions bicarbonates et Cl^- (270).

Le rôle principal du canal CFTR via la sécrétion de Cl^- est de réguler l'équilibre osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Le but étant de maintenir une bonne hydratation du mucus présent au niveau du pôle apicale des cellules épithéliales (Figure 31). Le

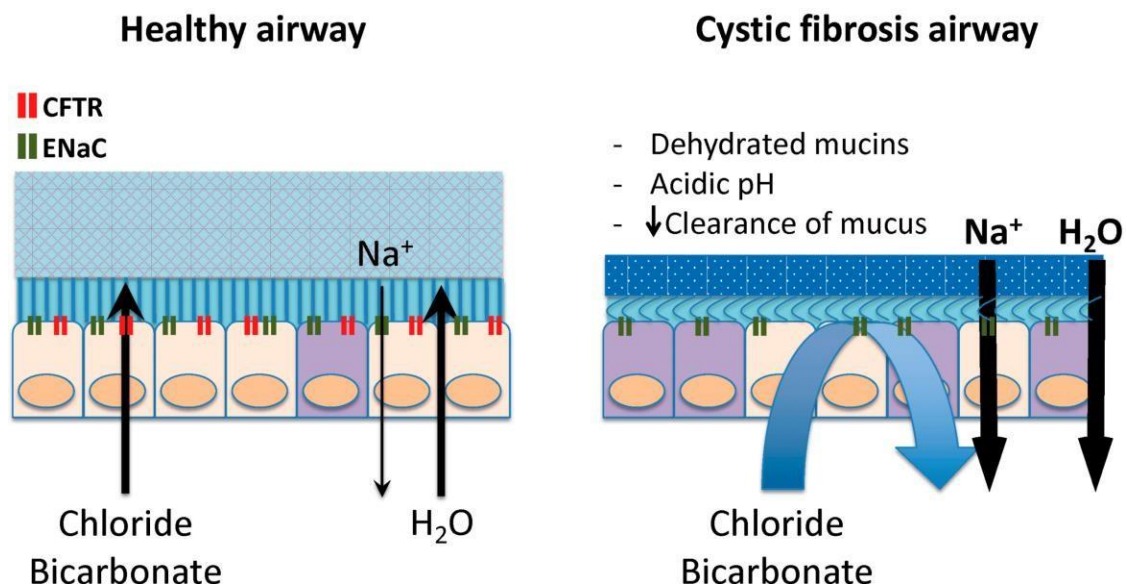


Figure 31 : Schéma représentant la régulation de la sécrétion d'ions par les canaux CFTR et ENaC dans un cas physiologique sain (à gauche) ou dans un cas pathologique (à droite). (C. Bergeron and A. M. Cantin, 2021)

En temps normal, les canaux CFTR et ENaC agissent ensemble pour réguler le passage d'ions entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Dans la mucoviscidose, un déséquilibre se crée à cause d'une anomalie de fonctionnement pour le canal CFTR. Cela conduit à une déshydratation du mucus, une baisse de la clairance mucociliaire et une acidification du pH causant des dommages à l'organisme.

bicarbonate joue également un rôle vital au niveau des voies aériennes et intestinales. Il est responsable de la régulation du pH en alcalinisant le milieu, et permet la structuration du mucus en complexant les mucines entre elles qui sont leur composant majeur (289). Les composés thiocyanates et glutathion ont aussi leur utilité notamment au niveau de la défense de l'organisme face aux pathogènes extérieurs. Les thiocyanates permettent la formation d'hypothiocyanite, elle-même impliquée dans la catalyse d'enzymes à effet antimicrobien dans les voies respiratoires. Le glutathion quant à lui est un tripeptide qui a un rôle central dans la lutte contre les espèces réactives à l'oxygène.

b. Régulation d'autres canaux ioniques

Le CFTR joue un rôle important également dans la régulation de l'activité de nombreux canaux ioniques dont ENaC (290). En effet, ce dernier travaille de concert avec le CFTR en absorbant les ions sodium au sein de la cellule, participant ainsi à la régulation de la pression osmotique entre le milieu intra et extracellulaire (290). Cela joue un rôle vital dans l'hydratation du mucus, la première barrière physique empêchant l'entrée d'agents potentiellement pathogènes dans l'organisme. La régulation de sa viscosité est centrale afin qu'il soit facilement renouvelé dans le but d'éviter l'accumulation de micro-organisme dans les voies respiratoires et intestinales, ce phénomène est appelé la clairance mucociliaire.

En dehors de ENaC, d'autres canaux sont également régulés via le CFTR (Figure 32).

Effected protein	Interaction	NBD1 required
ENaC	Inhibition	Yes
NHE	Inhibition	?
AE, Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻	Activation	?
ORCC, IRCC (ClC-3B?)	Activation	Yes
CaCC	Activation/inhibition	Yes (R-domain)
VRAC	Activation/inhibition	Yes ? (R-domain)
		NBD2 required
ROMK2, KIR6.1	Glibenclamide sensitization	Yes
K _v LQT1	Activation	Yes
Aquaporines, AQP3	Activation	Yes
Connexins	Activation	?
Mucus secretion	Activation	?
ATP release	Activation	Yes
Glutathione transport	Activation	?

Figure 32 : Listes de famille de canaux régulés par le CFTR. (B. Nilius and G. Droogmans, 2003)

Nous pouvons citer notamment les échangeurs bicarbonates/Cl⁻, tel que SLC26A9, permettant d'aider à équilibrer finement la sortie et l'entrée de ces ions en collaboration avec le CFTR. La famille des SLC26 a aussi montré une implication dans la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (291). De plus, en interagissant avec le CFTR, il serait impliqué également dans la production de mucus (292).

Une autre deuxième grande famille régulée par le CFTR est la famille des *Ca²⁺-activated Cl⁻ channels*, qui est inhibée par l'activité du CFTR et intervient dans une grande variété de mécanisme cellulaire. Comme leur nom l'indique, ce sont des canaux faisant passer des ions Cl⁻ et activés par les ions calcium. Parmi ces canaux, il y en a un en particulier qui a été décrit comme ayant un lien très étroit avec le CFTR, ce canal se nommant *Anoctamine-1* ou TMEM16A. En effet certaines études ont montré que TMEM16A joue un rôle dans le transport d'ion bicarbonate et Cl⁻ et dont l'activité est augmentée quand le CFTR se trouve être

dysfonctionnel (293). Il a été montré que TMEM16A participerait à l'activation du canal CFTR (294).

En résumé, le CFTR est au centre de la régulation de mouvement d'ion permettant l'hydratation du mucus présent à la surface des cellules épithéliales. Il n'est pas le seul participant dans ce processus, mais il a un rôle important sur la régulation de nombreux autres canaux ioniques (295).

C. p.Phe508del-CFTR

1. Généralités

Comme écrit précédemment, la mutation p.Phe508del est la mutation la plus fréquemment retrouvée chez les patients atteints de mucoviscidose. C'est une mutation de classe II située au niveau du domaine NBD1, qui mène à la synthèse d'un CFTR mal formé. Ce dernier ne peut pas valider les étapes de contrôle qualité du RE, reste séquestré dans la lumière de cet organite et est rapidement dégradé (296–300). Il est estimé que seulement 1 % du p.Phe508del-CFTR arrive jusqu'à la membrane plasmique (271,301,302), montrant malgré tout une activité résiduelle (302). Cette mutation conduit à la formation d'un CFTR partiellement glycosylé d'un poids moléculaire d'environ 135 kDa (bande B). Cela signifie donc que le p.Phe508del-CFTR ne peut pas être transporté jusqu'à l'appareil de Golgi pour y finir sa maturation et suivre la voie conventionnelle de transport des protéines. En effet, le domaine NBD1 n'est pas en soit changé structurellement parlant mais c'est un domaine interagissant avec les deux TMDs et lié directement au domaine R. Les changements apportés par la mutation p.Phe508del-CFTR amènent entre autre à la déstabilisation de la liaison entre le domaine NBD1 et le domaine TMD2 (267,303). La conformation globale du p.Phe508del-CFTR est alors altérée, ce qui va l'amener à être reconnu par des protéines chaperons pendant sa traduction car les étapes de repliement s'effectuant pendant sa synthèse ne peuvent procéder normalement. Cela a pour conséquence de bloquer le p.Phe508del-CFTR aux premières étapes de contrôle qualité du RE et être dégradé via l'ERAD.

Durant sa synthèse, le p.Phe508del-CFTR est très vite dégradé par les chaperons responsables du système de contrôle qualité. Même si la CNX joue un rôle important dans la sélection de protéines à dégrader en fonction de leur état de repliement, il semble qu'elle ne soit pas centrale dans la dégradation du p.Phe508del-CFTR, contrairement au CFTR normal (280). Il semble que la mutation Phe508del-CFTR augmente l'affinité entre cette protéine et les chaperons Hsp70/Hsp90 intervenant lors du premier « checkpoint » du contrôle qualité du RE (304). Cependant, la CNX semble malgré tout jouer un rôle non négligeable dans la dégradation du p.Phe508del-CFTR. Comme le montre les effets du miglustat, un inhibiteur de la CNX dont le traitement *in vitro* améliore grandement la maturation du p.Phe508del-CFTR ainsi que son transport jusqu'à la membrane plasmique (305).

Le lien entre l'accumulation du p.Phe508del-CFTR dans la lumière du RE et le déclenchement de l'UPR reste encore aujourd'hui sujet à débat. En effet, d'un côté le p.Phe508del-CFTR est trop rapidement dégradé pour déclencher l'UPR, et il fait consensus que son déclenchement serait principalement dû à une forte réponse inflammatoire ou infectieuse, qui sont des paramètres retrouvés chez les patients atteints de mucoviscidose (103,306). Cependant, quelques subtilités soulignent la complexité de la régulation de ce mécanisme. En effet, certains résultats obtenus sur différents modèles, ont montré que la réponse inflammatoire pouvait être déclenchée indépendamment de la réponse infectieuse. Dans ces contextes les modèles étudiés étaient également plus sensibles au développement d'infections. Cela a soulevé l'hypothèse que des mutations sur le gène *CFTR* rendraient les voies respiratoires plus sujettes à de l'inflammation intrinsèque, en dehors de celle déclenchée par des infections bactériennes (307).

L'accumulation du p.Phe508del-CFTR, ou plus généralement de protéines mal repliées, dans la lumière du RE pourrait aussi être une cause de déclenchement de l'UPR, malgré quelques études stipulant le contraire (308,309). Ces dernières n'avaient cependant pas pris en compte l'effet de variations d'expression du p.Phe508del-CFTR. D'autres études ont donc étudié ce phénomène, notamment Rab et al. (2006) qui ont montré que l'augmentation de l'expression du WT-CFTR jouait un rôle significatif sur le déclenchement de l'UPR. Ils ont montré cela en inhibant le protéasome, laissant penser que limiter la dégradation des protéines, et donc d'augmenter leur quantité dans le RE, permet de déclencher l'UPR (310). L'année suivante, Kerbirou et al. ont montré que des cellules A549 surexprimant le p.Phe508del-CFTR avaient une augmentation d'expression des marqueurs d'activation de l'UPR ATF6 et Grp78 (105). Même si les modèles cellulaires étaient transduits pour surexprimer un CFTR recombinant, ils ont vérifié que cette modification ne causait pas de stress du RE supplémentaire, ni de déclenchement de l'UPR (105,310).

Il est donc très difficile de déterminer l'effet exacte de l'accumulation du p.Phe508del-CFTR dans le RE sur le déclenchement de l'UPR. Il est cependant possible que le p.Phe508del-CFTR face office de « goutte qui fait déborder le vase », et participe d'une manière au dépassement d'un seuil au-delà duquel l'UPR est déclenché.

L'explication précise du fait que cette forme mutée passe outre les étapes de contrôle qualité du RE et de l'ERAD n'a aujourd'hui toujours pas été trouvée. Mais des réponses commencent à être apportées depuis ces dernières années avec le début de la description de la voie de l'UPS.

2. Transport non conventionnel du p.Phe508del-CFTR

Historiquement, il était pensé que seules les protéines sécrétées et transmembranaires correctement formées pouvaient atteindre leur lieu de fonction par le mode de sécrétion dit conventionnel. Cela après avoir validé les étapes de contrôle du RE et avoir subi les différentes étapes de maturation au cours de leur transport le long de l'axe RE-Golgi. Il était admis que les protéines mutées mal repliées étaient rapidement dégradées par l'ERAD pendant ou après leur synthèse dans le RE. Depuis une dizaine d'années, l'UPS a cependant été décrite comme une voie de transport pouvant permettre le transport de protéines sécrétées « leaderless » ou transmembranaires mutées jusqu'à la membrane plasmique (311–313).

L'UPS est un processus se mettant en place lorsque la cellule subit un stress (314) et se divise en quatre types distincts (Figure 33). Le type I correspond à la translocation à travers la membrane plasmique de protéines sécrétées par l'intervention de pores. Le type II est similaire au premier mais fait intervenir des canaux faisant parti des transporteurs ABC, ce qui requiert une dépense d'énergie sous forme d'ATP. Le type III permet l'exocytose de protéines grâce à l'intervention d'endosomes tardifs et d'autophagosomes (315). Ces trois types concernent les protéines « leaderless » avec ou sans segments transmembranaires. Le cas de l'UPS de type IV est différent car il concerne les protéines transmembranaires synthétisées dans le RE, mais qui évitent le passage par l'appareil de Golgi pour être transportées jusqu'à la membrane plasmique. C'est ce type d'UPS qui nous intéresse dans ce projet de recherche.

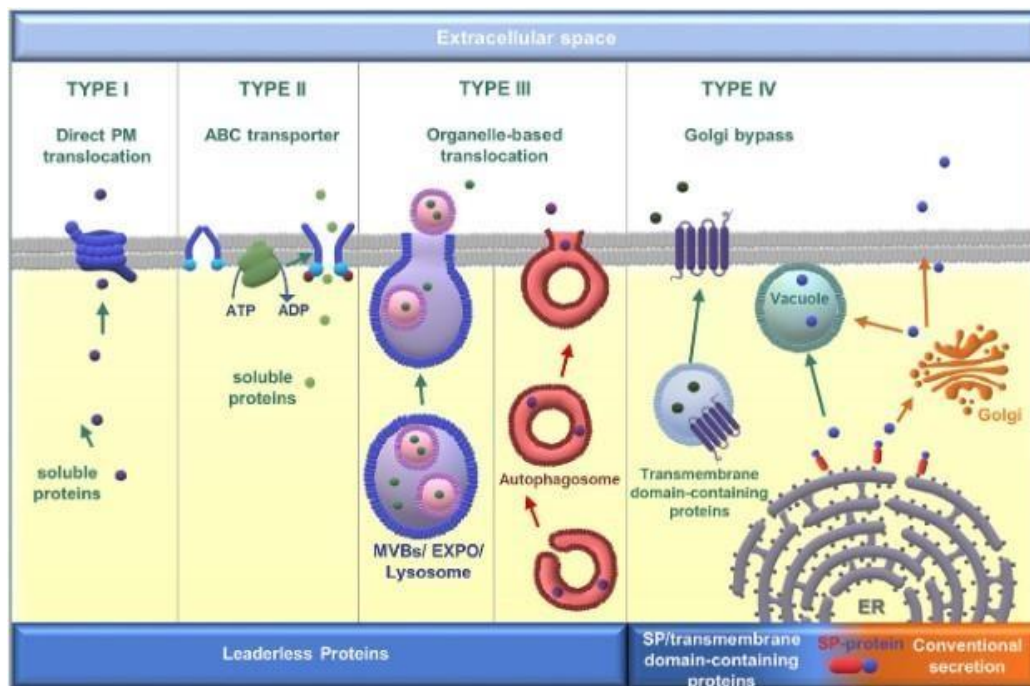


Figure 33 : Schéma représentant les différents types d'UPS existants. (Modifiée de Maricchiolo et al., 2022)

Les types I, II et III de l'UPS sont empruntés par les protéines « leaderless », qui ne possèdent pas de séquence d'adressage au RE. Le type I permet la sécrétion de protéines dans le milieu extracellulaire directement à travers la membrane plasmique grâce à des pores. Le type II est similaire au premier mais fait intervenir des canaux demandant une dépense en ATP pour pouvoir fonctionner. Le type III utilise des vésicules de transport, telles que les corps multivésiculaires ou les autophagosomes, contenant les protéines à transporter.

Le type IV est utilisé pour le transport de protéines contenant un ou plusieurs domaines transmembranaires. C'est ce mécanisme utilisé par le transport de certaines protéines mutées, via l'intervention de corps vésiculaires tels que les autophagosomes.

Concernant le p.Phe508del-CFTR, il fait consensus depuis longtemps qu'une faible quantité peut se retrouver à la membrane plasmique (271,301,302). Initialement, de premières études ont montré cela en ajoutant que diminuer la température d'incubation des cellules à 28 ou 29°C permettait d'augmenter le taux de p.Phe508del-CFTR membranaire (316–318). Mais à ce stade, la raison pour laquelle le p.Phe508del-CFTR arrive jusqu'à la membrane restait inconnue. Cependant, des découvertes sur les différentes voies de l'UPS ont commencé à voir le jour dans le but d'expliquer le mécanisme.

Il a fallu attendre que les protéines GRASPs soit étudiées dans des modèles invertébrés pour montrer que ces protéines jouaient un rôle dans le transport non conventionnel de divers protéines sécrétées telles que l'interleukine 1 β , l'*acyl-coenzyme A-binding protein* ou l'intégrine α (319–322). Ainsi, en 2011, une équipe a montré que GRASP55 était un élément crucial dans le transport membranaire du p.Phe508del-CFTR en se fixant à lui par des domaines communs appelés PDZ (266). Dans cet article, ils ont mis en évidence cette interaction en bloquant l'activité de Arf1, responsable de la formation des vésicules COP-I, et en utilisant la thapsigargine, un inducteur de l'UPR. Ces deux conditions étant inductrice de l'UPR, ils ont étudié l'implication des différents effecteurs de cette voie, et ont mis en évidence que le transport non conventionnel du p.Phe508del-CFTR était dépendant de l'état d'activation d'IRE1 α .

Une autre équipe avait montré précédemment que IRE1 α régulait Sec16a, une protéine clé pour le transport conventionnel des protéines (323). Une étude a ensuite vu le jour pour montrer l'implication de Sec16a, en induisant un stress cellulaire par traitement à la thapsigargine ou en bloquant le transport RE-Golgi. Ils ont découvert que Sec16a était nécessaire dans le transport conventionnel et non conventionnel des protéines, dont le p.Phe508del-CFTR, avec la présence d'une interaction directe avec GRASP55 (324).

Puis, dans des levures, il a été montré que le transport non conventionnel d'interleukine 1 β , d'*insulin-degrading enzyme* ou encore de l'*acyl-coenzyme A-binding protein* était également lié à l'expression de certains acteurs impliqués dans l'autophagie (319,320). Cela a été vérifié par la suite chez les mammifères avec, en prime, un screening de protéines composantes des ESCRTs, dont quelques-unes semblent être vitales pour le transport du p.Phe508del-CFTR médié par l'UPS (248). Cela fait écho à une autre publication, plus ancienne, qui avait montré que les composants du complexe ESCRT-II au niveau des endosomes possèdent un domaine nommé *GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45 GLUE*. Ce domaine permet de fixer les PI3P, un des composants majoritaire de la membrane des autophagosomes, ce qui laisse penser qu'une interaction, voire une fusion, entre les endosomes et les autophagosomes serait possible (325). Enfin, récemment, des études ont montré que GRASP55 arbore le motif LIR ce qui lui permettrait de faire office de lien entre LC3 (donc les autophagosomes) et le CFTR (246,326).

D. Atteintes systémiques

La protéine CFTR est cruciale pour le fonctionnement des cellules épithéliales. Etant donné que ces cellules jouent un rôle dans un grand nombre d'organes, le dysfonctionnement d'un tel acteur peut avoir des conséquences désastreuses sur l'organisme entier. C'est pourquoi la mucoviscidose, bien que connu pour les troubles respiratoires qu'elle suscite, est une maladie à atteintes multi-systémique (Figure 34) avec une gravité variant selon le profil génétique du patient. Typiquement, les mutations de classe I, II et III vont entraîner les formes de mucoviscidose les plus sévères.

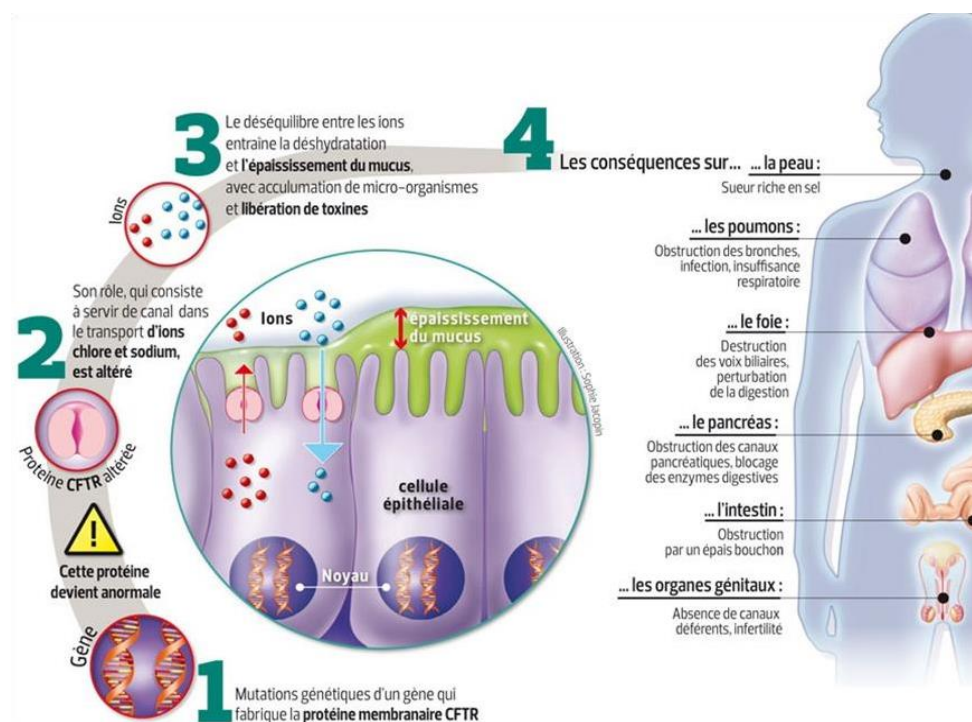


Figure 34 : Représentation de l'impact systémique de la mucoviscidose sur l'organisme. (<http://sante.lefigaro.fr>)

1. Respiratoires

Les atteintes respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose sont les plus connues car elles sont responsables de 60% des causes de mortalités.

Le CFTR dysfonctionnel ne peut pas remplir son rôle d'échangeur d'ion entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Les conséquences vont se ressentir au niveau du pôle apical des cellules épithéliales des voies respiratoires, c'est-à-dire au niveau du tractus broncho-pulmonaire. Toute cette zone est recouverte d'un mucus permettant de protéger les cellules d'agressions extérieures, notamment vis-à-vis de microorganismes pathogènes. En temps normal, les cils présents à la surface des cellules épithéliales permettent de balayer le mucus afin de l'évacuer vers la trachée, supprimant dans le même temps les agents extérieurs indésirables. Dans le cas de la mucoviscidose, un déséquilibre osmotique se crée concentrant les cellules en ions Cl^- et les poussant à absorber l'eau du milieu extracellulaire, déshydratant le mucus et augmentant donc sa viscosité. Cela va avoir pour conséquence de compliquer sérieusement la clairance muco-ciliaire, ce qui cause des toux chroniques (327).

En parallèle, il y a également une acidification du milieu due au manque d'ions bicarbonates relargués dans les voies respiratoires. Finalement, de nombreux micro-organismes, potentiellement pathogènes, peuvent se développer menant au déclenchement de réponses inflammatoire et infectieuse. Parmi les infections bactériennes, celles à *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sont les plus fréquentes. A causes de ces infections, les patients peuvent développer des pathologies pulmonaires comme des pneumonies, des bronchites, des sinusites ou encore de l'asthme (328).

De plus, les réponses inflammatoire et infectieuse étant chroniques et sur-stimulées, les tissus pulmonaires se fibrosent peu à peu engendrant une insuffisance respiratoire qui est la principale cause de mortalité de la mucoviscidose (329,330).

Des affections pulmonaires peuvent alors découler de cette dégradation du tissu pulmonaires. Parmi les moins fréquentes, le pneumothorax, qui touche 3,4% des patients, est une perforation de la plèvre mettant en place une connexion entre l'intérieur du poumon et la cavité pleurale. Cette dernière se remplit alors d'air, comprimant le poumon et provoquant des gênes respiratoires et des douleurs thoraciques. Nous pouvons citer également l'hémoptysie (3% des patients) qui se caractérise par des toux sanglantes due à la dégradation de la paroi des artères bronchiques. Enfin, une des affections les plus courantes, mais dont les risques d'apparition dépendent de l'âge du patient, est la rhinosinusite chronique avec la présence de polypes nasaux. Cette pathologie inflammatoire se traduit par des sensations de gonflements au niveau du nez et des sinus pouvant mener à des sensations de pressions à ces endroits, ainsi qu'à des maux de tête (328).

2. Digestives

Même si les difficultés respiratoires rencontrées dans cette maladie sont les plus délétères, les atteintes digestives participent à aggraver l'état général des patients. Historiquement, l'appellation de fibrose kystique pour la mucoviscidose vient du fait que les premières descriptions expliquaient le décès des patients comme dues à des insuffisances pancréatique et hépato-biliaire.

En effet, 85% des patients atteints de mucoviscidose sont également touchés par une insuffisance pancréatique, caractérisée par une mauvaise absorption des nutriments dans le tractus intestinal et une fibrose du pancréas. Le pancréas a une fonction endocrine, via la sécrétion d'insuline, et une fonction exocrine via la sécrétion d'enzymes digestives. En temps normal, le CFTR permet d'hydrater les sucs pancréatiques de la même manière que pour son effet hydratant du mucus respiratoire. La libération d'ions bicarbonate joue un rôle prépondérant dans la régulation du pH des enzymes sécrétées. Dans le cas d'un CFTR muté, il va y avoir une accumulation d'enzymes qui sont alors en milieu trop acide pour être totalement efficace. Il en résulte une mauvaise digestion et absorption des nutriments pouvant causer des arrêts de transit menant à des douleurs abdominales. Une conséquence plus délétère est l'obstruction des canaux pancréatiques conduisant finalement à une fibrose du pancréas à cause

des enzymes stagnantes (331). Cette fibrose peut s'étendre jusqu'aux îlots de Langerhans, détruisant les cellules β conduisant à l'apparition d'un diabète de type I (332).

Enfin, la seconde cause de mortalité est due aux atteintes hépatobiliaires. Le CFTR dysfonctionnel présent dans la vésicule biliaire et ses canaux ne permet plus d'hydrater et de réguler le pH de la bile sécrétée. Elle va alors s'accumuler et dégrader petit à petit les cellules hépatiques, avec l'apparition d'espèces réactives à l'oxygène et le déclenchement d'une réponse inflammatoire chronique produisant à long terme une fibrose hépatique, puis une cirrhose du foie (333).

3. Génitales

Les atteintes génitales sont également très fréquentes chez les patients atteints de cette pathologie. Notamment pour les hommes chez lesquels 98% d'entre eux sont touchés par une azoospermie obstructive. L'absence congénitale bilatérale des canaux déférents résulte d'un manque d'hydratation du mucus dans ces canaux pendant le développement *in utero*, ce qui induit leur involution, rendant l'individu stérile. Les femmes sont également touchées par ce type d'atteintes en les rendant souvent moins fertile qu'un individu sain. En effet, l'épaississement du mucus et la diminution du pH, dû aux déséquilibres en ions bicarbonates, réduisent fortement la mobilité et les capacités fécondatrices des spermatozoïdes (334).

E. Traitements

Malgré les nombreuses années de recherche sur la mucoviscidose, cette maladie reste incurable et les traitements actuels sont symptomatiques. Pourtant de grandes avancées ont été faites dernièrement, avec une espérance de vie des patients qui était d'une vingtaine d'années il y a vingt ans, à une quarantaine d'année aujourd'hui (Figure 35).

Indicateurs	Années d'enquête										
	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Nombre de décédés	55	59	73	47	57	60	62	43	47	46	56
- dont patients porteurs d'un transplant	27	31	41	25	38	36	37	22	26	33	41
Taux brut de mortalité (pour 1000)	9.1	9.5	11.5	7.2	8.5	8.8	8.9	6.0	6.5	6.3	7.5
Age moyen (années)	32.2	35.6	29.5	35.5	32.4	35.8	34.8	35.6	37.0	42.5	44.2
Age médian (années)	27.8	32.2	27.4	32.5	28.2	33.8	31.7	35.9	33.0	39.1	40.8
Age minimum (années)	2.2	1.1	0.1	9.0	1.6	6.0	7.3	0.4	0.3	12.8	21.5
Age maximum (années)	88.4	82.5	71.2	83.2	81.7	74.3	80.9	65.9	85.8	82.2	82.2

Registre français de la mucoviscidose 2022

Figure 35 : Tableau récapitulatif du nombre de décès de patients atteints de mucoviscidose en France entre 2012 et 2022. (Registre français de la mucoviscidose 2022)

1. Traitements asymptomatiques

Jusqu'à récemment, les traitements apportés aux patients atteints de mucoviscidose étaient uniquement asymptomatiques. Un vaste panel de molécules est encore utilisé à ce jour

afin de prévenir, ou au moins de ralentir, la dégradation de la fonction respiratoire afin de faciliter au maximum le quotidien des patients.

Les mucolytiques sont des molécules utilisées quotidiennement (deux fois par jour) qui permettent d'améliorer les échanges d'air en limitant l'obstruction des voies respiratoires causée par l'accumulation de mucus (328). Ces composés sont associés avec des bronchodilatateurs, appliqués sous forme d'aérosols, qui permettent d'augmenter le diamètre des bronches. Cette combinaison permet, au moins temporairement, de soulager la détresse respiratoire de l'individu.

Les antibiotiques sont des incontournables dans la mucoviscidose pour lutter contre les infections bactériennes. La tobramycine et l'aztréonam par exemple sont des antibiotiques permettant de lutter contre les bactéries à gram négatif telles que *Pseudomonas aeruginosa*, mais un maximum de deux administrations par mois est nécessaire pour prévenir le développement d'une antibiorésistance (328).

Deux types de molécules sont utilisés pour combattre l'inflammation : les glucocorticoïdes et les anti-inflammatoires non stéroïdiens.

Les glucocorticoïdes peuvent être prescrits oralement ou par inhalation, même si, sous cette dernière forme, aucun effet bénéfique n'a été reporté sur des patients traités pendant six mois (335). Ces molécules possèdent un large éventail de cibles, parmi lesquelles sont retrouvées les cytokines pro-inflammatoires *Interleukin-1*, *Interleukin-8* et les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 (336). Les glucocorticoïdes peuvent également être prescrits suite à des infections par le champignon *Aspergillus fumigatus* qui peut déclencher une forme d'allergie pouvant altérer la fonction pulmonaire. Des corticoïdes peuvent également être recommandés si le patient présente de l'asthme (328). Leur utilisation peuvent déclencher à moyen et long terme des effets secondaires comme le développement d'une cataracte, une intolérance au glucose ou de l'ostéoporose (336).

Parmi les anti-inflammatoires non stéroïdiens, l'Ibuprofène reste le traitement phare pour les patients atteints de mucoviscidose. Comme effet secondaire, l'Ibuprofène peut cependant déclencher des saignements gastro-intestinaux si son utilisation est trop prolongée (336). L'azithromycine est également un autre anti-inflammatoire qui présente de nombreux avantages. En plus de ces effets antibiotiques, notamment contre *Staphylococcus aureus*, il a été montré que son utilisation augmentait la fonction respiratoire et réduisait les exacerbations pulmonaires (328). Il peut être administré trois fois par semaine, mais peut engendrer des résistances dans des cas d'infections par des mycobactéries (337). Malgré ces effets bénéfiques, il a été reporté que ses effets anti-inflammatoires n'étaient pas observés *in vitro* dans cellules issues de patients atteints de mucoviscidose (338).

Au niveau intestinal, des compléments sous formes de gélules permettent d'apporter un surplus d'enzymes intestinales, dans le but d'améliorer l'absorption des nutriments et de limiter

les désagréments intestinaux liés à la maladie (339). Autrement, des compléments en vitamines A, D et E peuvent être apportés afin de prévenir l'apparition de carences menant parfois à des manifestations graves sur l'organisme, telles que des problèmes de visions ou une fragilité osseuse (328).

2. Transplantation pulmonaire

La transplantation pulmonaire est une solution permettant aux patients de gagner considérablement en qualité de vie, et d'augmenter leur espérance de vie médiane de 9,5 ans (328). Cependant, son accessibilité est limitée par plusieurs facteurs.

En effet, la transplantation est principalement proposée aux patients présentant une altération des facultés respiratoires avancées mais sans pour autant être critique. La transplantation est réservée aux patients ayant un volume expiratoire maximale par seconde (VEMS) inférieur à 50% ou pour ceux dont la dégradation de cette dernière est très rapide (de l'ordre d'une diminution d'au moins 20% par an) (328,340). La difficulté est qu'il n'y a pas de fenêtre de décision idéale concernant le choix de réaliser une greffe pulmonaire, et le caractère urgent de ce type d'intervention ne laisse pas le temps d'examiner en profondeur les besoins de chaque patient, rendant cette solution difficilement accessible pour le plus grand nombre.

L'autre difficulté vient du fait que la greffe est nécessaire dans beaucoup de pathologies pulmonaires, faisant qu'une forte demande existe avec peu de donneurs existants permettant de réaliser une transplantation sur des patients compatibles.

Un suivi précoce permet néanmoins de sensibiliser et d'informer sur les enjeux médicaux, psychologiques et financiers de la transplantation pulmonaire. Ce suivi permet de mieux catégoriser les différents cas, en permettant aux cas les plus urgents d'avoir accès à cette solution rapidement. Une ligne directrice a été réalisée par la *Cystic Fibrosis Foundation* pour permettre de prendre en charge au plus tôt et de mieux référencer les patients atteints de troubles pulmonaires avancés (340).

3. Thérapies protéiques

Les thérapies protéiques sont aujourd'hui les traitements montrant le plus d'efficacité sur la restauration des facultés pulmonaires chez les patients. Toutes les molécules n'ont pas les mêmes modes d'actions ni les mêmes sites de fixation sur la protéine CFTR, certaines molécules ciblent également des protéines en lien avec le CFTR. Dans cette partie, nous allons en majorité nous focaliser sur les molécules développées par le laboratoire Vertex Pharmaceuticals (Boston, Massachusetts, Etats-Unis), car ce sont les seules qui sont ou qui ont été utilisées dans le cadre des traitements. Cependant, il est important de noter que de nombreuses autres molécules, issues d'autres laboratoires, sont actuellement en développement (Figure 36). Nous allons décrire les différents types de modulateurs existants, pour ensuite nous intéresser à leurs combinaisons.

Class of Drug	Agents	Current Status
Gene replacement therapy	pGM169/GL67A (UK CF Gene Therapy Consortium)	Primary end point met in phase IIb clinical trial (59)
mRNA repair	QR-010 (ProQR Therapeutics)	Trials of nasal delivery and nebulization underway
Read-through agents	Ataluren (PTC124; PTC Therapeutics)	Recent announcement of 2nd phase III trial failure http://ir.ptcbio.com/releasedetail.cfm?releaseid=1015471
Amplifier	PTI-428 (Proteostasis Therapeutics Inc)	Early-phase trials of oral agent underway
Correctors (+/-potentiator)	Lumacaftor/ivacaftor (Orkambi, Vertex) Tezacaftor (VX661)/ivacaftor (Kalydeco; Vertex)	Licensed for F508del homozygous patients Phase III program in F508del homozygous and heterozygous patients underway
	Next-generation triple component drugs (Vertex)	Early-phase trials underway with several agents administered with 661/ivacaftor
	Riociguat (Bayer)	Phase II trial underway
	GLPG2222 and GLPG2737 (Galapagos)	Early-phase trials underway
Potentiator	FDL169 (Flatley Discovery Labs) Ivacaftor (Kalydeco; Vertex)	Phase II trial to commence 2017 Licensed for patients with gating mutations aged 2 years and older and R117H
	GLPG1837 (Galapagos)	A component of all Vertex's combination drugs
	QBW251 (Novartis)	Phase II trial data awaited
	GLPG2451 (Galapagos)	Phase II study results awaited
	GLPG3067 (Galapagos)	Early-phase trials as mono and in combination with GLPG2222
	Deuterated ivacaftor (CTP-656, Concert)	In phase I trial
Stabilizer	Cavosonstat (N91115; Nivalis Therapeutics)	In phase II trial of patients with gating mutations Recent announcement of failed phase II trial http://ir.nivalis.com/press-releases/detail/60
ENaC inhibitor	VX-371 (Vertex)	In phase II trial in patients on Orkambi (also being tested in primary ciliary dyskinesia [PCD])

Figure 36 : Principales molécules connues en utilisation ou avec des effets prometteurs pour le traitement de patients atteints de mucoviscidose. (Davies et al., 2019)

a. Correcteurs

Les correcteurs sont des molécules pharmacologiques destinées à restaurer le transport du CFTR pour les patients présentant une mutation de classe II. Ces correcteurs peuvent être catégorisés en trois classes en fonction de leur lieu de fixation sur le CFTR. La classe I stabilise les interactions entre le NBD1 et les deux TMDs, la classe II cible le NBD2 pour faciliter ses interactions avec des protéines chaperons, et la classe III stabilise la conformation du domaine NBD1 (341). Les principaux correcteurs connus, car utilisés ou ayant été utilisés chez des patients, sont issus du laboratoire Vertex Pharmaceuticals. Le premier correcteur à avoir montré de bons effets est le VX-809 (Lumacaftor®) qui fait partie de la classe I (Figure 36). Ce dernier avait de bons résultats sur des patients possédant la mutation p.Phe508del, avec une augmentation de 14% des flux d'ions chlore liés à l'activité du CFTR (342).

Cependant, une nouvelle génération de correcteurs à vue le jour car ils réagissaient mieux en thérapie combinée (Figure 36). Parmi eux, deux correcteurs sont actuellement utilisés dans le traitement des patients. Le VX-661 (Tezacaftor®), de classe I, et le VX-445 (Elexacaftor®), de classe III, se fixent à différents endroits du CFTR ce qui permet d'obtenir une synergie améliorant son transport jusqu'à la membrane plasmique (343).

b. Potentiateurs

Les potentiateurs sont les molécules qui vont permettre d'augmenter la probabilité d'ouverture du canal CFTR. Le VX-445 précédemment cité possède, en plus de ses capacités correctrices, un effet co-potentiateur sur le canal CFTR en association avec le VX-770 (344). Mais la molécule potentiatrice phare, utilisée depuis quelques années maintenant dans le traitement des patients, est le VX-770 (ou Ivacaftor®, commercialisé sous le nom Kalydeco®) (Figure 36). Approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) et commercialisé en 2012, le VX-770 ciblait à l'époque les patients ayant au moins une copie de la mutation G551D-CFTR et touchant également les classes de mutations III et IV. Ses premiers tests ont montré que le VX-770, en association avec d'autres traitements contemporains, augmentait la VEMS de 17,2% en comparaison au placebo au bout de 48 semaines de traitement. Le VX-770 a également apporté des améliorations au niveau intestinal car les patients ont réussi à regagner du poids après ce traitement, alors qu'une diminution de la masse pondérale est normalement observée en absence de traitement (345). Cependant, le VX-770 a montré que son utilisation en thérapie combinée entraînait une déstabilisation de la protéine CFTR (346,347).

c. Stabilisateurs

Les stabilisateurs permettent d'améliorer la demi-vie du CFTR utilisées dans le cas de mutation de classe VI. Le CFTR dans ces cas-ci est synthétisé et exporté à la membrane normalement en présentant une activité. Cependant ce type de mutation fait qu'il est instable à la membrane ce qui accélère sa vitesse de recyclage diminuant au final son activité dans le temps. Même si aucun stabilisateur n'est utilisé à ce jour en tant que traitement chez les patients, cela reste malgré tout une piste d'amélioration intéressante. C'est ce qu'avait montré le Cavosonstat (N91115), développé par Nivalis Therapeutics, inhibant la *S-nitrosoglutathion* et augmentant la stabilité du canal CFTR muté à la membrane (Figure 36) (348).

d. Amplificateurs

Les amplificateurs sont la dernière classe de molécule développée à ce jour. Ces molécules permettent de stabiliser l'ARNm du CFTR et ainsi d'espérer augmenter sa synthèse protéique globale. C'est notamment le cas du PTI-428 (ou Nesolicaftor®) développé par Prosteostasis Therapeutics Inc (Figure 36). Cette molécule se fixe à la *Poly(rC)-binding protein 1 PCBP1* augmentant les effets de cette protéine et permettant de stabiliser l'ARNm du CFTR (349).

e. Principales thérapies protéiques combinées

Les nombreuses molécules développées ont montré des effets bénéfiques sur l'amélioration des capacités respiratoires chez les patients. Mais leur plein potentiel a été révélé lorsqu'une combinaison entre ces différentes molécules est effectuée. En effet, en 2015, l'association VX-809/VX-770 (Orkambi®) a été approuvée par la FDA comme traitement chez les patients ayant des mutations de classes II, les tests cliniques ayant été effectués sur des homozygotes pour la mutation Phe508del-CFTR. Cette association n'a été prescrite qu'un temps car le VX-770 associé au VX-809 entraînait une réduction de la demi-vie du CFTR au niveau de la membrane plasmique (346). Une seconde combinaison de molécule a alors vu le jour en 2017, l'association de VX-661/VX-770 (Symdeko®). Cette dernière s'est montrée beaucoup plus efficace que la précédente lors d'un test sur des patients atteints de douze ans et plus, auxquels a été administré le Symdeko® pendant vingt-quatre semaines (350). La VEMS a été enregistrée de 4% à 6,8% plus forte que celle prédite en comparaison au placebo. Contrairement à l'Orkambi® où les mesures avaient relevé une augmentation moyenne de 2,6% à 4% (351). De plus, la réduction du taux de Cl⁻ dans la sueur a été significativement diminuée après le traitement au Symdeko® (-10,1 mmol/L), là où Orkambi® n'avait montré qu'une réduction très faible, similaire à celle observée avec un traitement au VX-770 seul (351). Pour finir, des troubles respiratoires et une diminution progressive de la VEMS avaient été observés lors du traitement à l'Orkambi®, ce qui avait conduit certains participants à arrêter la prise de traitement. Tous ceci n'a pas été observé dans le cas du Symdeko®.

En 2019, la FDA approuve la mise sur le marché du Trikafta/Kaftrio®, une nouvelle solution thérapeutique s'avérant être une trithérapie combinant le VX-445/VX-661/VX-770. Cette nouvelle thérapie, s'adressant aux patients de deux ans et plus, peut être prescrite à des patients hétérozygote pour la mutation Phe508del-CFTR et présentant une deuxième mutation qui résulte en la production d'un canal CFTR à activité résiduelle. C'est une avancée considérable car désormais environ 80% des personnes atteintes de mucoviscidose sont éligibles à ce traitement. Son efficacité a été testée sur des patients homozygotes et hétérozygotes pour la mutation Phe508del-CFTR. En comparaison avec la VEMS prédite, la VEMS a vu une augmentation de 13,8% chez les patients hétérozygotes, et une de 11% chez les homozygotes (352). Cependant, il a été reporté récemment que l'utilisation du VX-770 dans le Trikafta/Kaftrio®, comme pour l'Orkambi®, réduisait la stabilité du canal CFTR diminuant l'efficacité de ce traitement (347). Ajouter à cela des effets secondaires indésirables telles que des maux de têtes, une chance accrue d'infection des voies respiratoires, des vertiges ou des insomnies, le besoin d'améliorer cette thérapie est indéniable. Une autre combinaison avait été étudiée en même temps que pour le Trikafta/Kaftrio®. Cette autre association était également constituée de VX-661 et de VX-770, mais remplaçait le VX-445 avec le correcteur VX-659 (Bamocafort®). Ces effets, évalués dans les mêmes conditions, étaient similaires à ceux

observés chez le Trikafta/Kaftrio®, mais avec une VEMS enregistrée légèrement moindre (13,3% chez les hétérozygotes et 9,7% chez les homozygotes) (353).

Bien que les fonctions respiratoires soient considérablement améliorées avec la trithérapie, de nombreux effets secondaires peuvent être observés chez certains patients. De plus, ce traitement n'est pas disponible pour tous, 10 à 20% des patients ne rentrent pas dans les critères d'éligibilités pour avoir accès à ce traitement. En plus de cela, nous avons vu que l'utilisation du VX-770 ne rendait pas la composition de ce traitement optimale (347). Enfin, l'ajout du stabilisateurs PTI-428 au Trikafta/Kaftrio® dans des cellules pulmonaires *in vitro*, augmente significativement la fonction du canal CFTR et le battement ciliaire (354). Cela montre la nécessité de diversifier les types de modulateur à associer, que cela soit par l'ajout de stabilisateurs mais aussi d'amplificateurs.

4. Thérapie par miARN

Les miARN sont issus de la transcription et de la maturation d'ARNm spécifiques d'une longueur allant de 21 à 23 nucléotides. Ils appliquent une régulation positive ou négative en se fixant sur des motifs, nommés *miRNA response element*, situés en 3'-UTR des ARNm produits par les gènes cibles. Un miARN peut avoir plusieurs cibles différentes et ces qualités inhibitrices sont dépendantes du tissu observé, ainsi que de l'âge de l'organisme étudié. Il est estimé que 60% des gènes codant pour des protéines sont régulés par ces miARN. 28.000 miARN ont été recensés à ce jour (355).

Au niveau thérapeutique, deux types de miARN sont à distinguer. Le premier type appelé *mimics*, concerne ceux qui vont mimer l'effet d'un miARN dont la fonction a été perdue dans le contexte pathologique étudié, dans le but de restaurer les effets de ce miARN manquant. Le deuxième type désigne les antagonistes de miARN. A l'inverse du premier, ceux-ci vont permettre d'inhiber un miARN endogène impliqué d'une manière ou d'une autre dans la pathologie d'intérêt (355).

De nombreuses études ont commencé à s'intéresser à l'utilisation de cette piste thérapeutique prometteuse, notamment dans le cadre de l'hépatite C, de cancers et dans la mucoviscidose.

Concernant la mucoviscidose, deux cibles sont principalement étudiées pour évaluer les effets de miARN. La première cible est évidemment le CFTR, une équipe ayant montré que l'utilisation de miARN antagonistes empêchait la fixation de deux miARN qui régulent négativement l'expression du CFTR (356). La deuxième cible est TMEM16A, un canal impliqué dans les efflux d'ions Cl⁻ et bicarbonates. Tout comme les tests effectués sur le CFTR, le blocage de fixation de certains miARN régulant négativement l'expression par des antagonistes permet d'améliorer ses efflux d'ions Cl⁻ et d'améliorer la clairance mucociliaire (357). Dans le cas de la mucoviscidose, cette dernière cible semble pertinente car tous les patients pourraient, théoriquement, avoir accès et être éligible à ce traitement. Trouver un mode

d'administration efficace de ce type de thérapie reste cependant un défi à relever, notamment en garantissant un franchissement efficace à travers le mucus épais caractéristique de la maladie (355).

5. Thérapie génique

De manière générale, la thérapie génique est une solution prometteuse pour un grand nombre de pathologies. Les premiers essais cliniques, tout domaine confondu, ont débuté en 1989. Le principe repose sur l'utilisation de vecteurs synthétiques ou viraux afin d'administrer aux patients des copies saines du gène altéré par la mutation à l'origine de la maladie. Dans le cas de la mucoviscidose, cette thérapie peut amener à des résultats intéressants étant donné le caractère monogénique de cette pathologie. Ainsi, de 2012 à 2014, un essai clinique sur 136 patients atteints de mucoviscidose a été effectué. Le résultat de cette thérapie a permis d'augmenter de 3,7% la fonction respiratoire des patients, une augmentation qui a atteint 6,4% chez les patients ayant une VEMS inférieure à 70% (358). Même si avec la trithérapie (Trikafta/Kaftrio) actuelle la fonction respiratoire est augmentée de 13,8% chez les patients hétérozygotes (Phe508del/mutation avec fonction résiduelle) et de 11% chez les patients homozygotes Phe508del, cela reste une avancée majeure car tous les patients pourraient être, théoriquement, traités à terme avec cette thérapie.

Le développement de la thérapie génique en synergie avec les thérapies protéiques peut également être une solution de choix en fonction des avancées dans ce domaine. Un des principaux défis que doit aujourd'hui relever la thérapie génique est de trouver un moyen de passer au travers du mucus, qui constitue la principale barrière permettant d'accéder à l'appareil respiratoire. Il reste donc vital de continuer à chercher de nouvelles voies thérapeutiques afin d'améliorer le quotidien des personnes atteintes de la mucoviscidose.

6. PF-429242

Le PF (4-[(Diéthylamino)méthyl]-N-[2-(2-méthoxyphényl)éthyl]-N-(3R)-3-pyrrolidinyl-benzamide dihydrochloride) est une molécule développée par l'entreprise Pfizer (New York, Etat de New York, Etats-Unis) (Figure 37). En 2007, Pfizer développait des

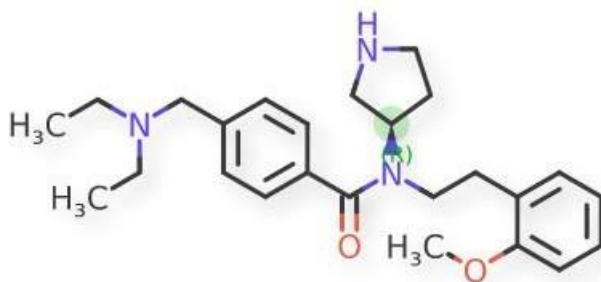


Figure 37 : Formule topologique de la molécule PF-429242. (National Center for Advancing Translational Sciences, Insight Drugs)

molécules dans le but d'inhiber la S1P afin de bloquer la synthèse de cholestérol et d'acides gras dans des cas pathologiques. Le PF-429242 est ressorti de cette étude comme le meilleur candidat, avec une concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) pour l'inhibition de la S1P égale à 170 nM (359).

D'abord testé sur l'état de clivage des SREBPs, ils ont montré qu'une inhibition totale de ce clivage était observé à 10 µM. L'IC₅₀ pour l'inhibition total de la voie de synthèse du cholestérol a été reporté à 600 nM, tandis que 43% d'inhibition de la voie de synthèse des acides gras a été atteint pour une IC₅₀ de 10 µM (359).

Des études *in vivo* ont vu le jour sur des souris mâles CD1. Deux doses différentes ont été administrées à deux groupes de cinq souris mâles CD1. A cause de sa faible biodisponibilité lors d'une administration par voie orale (5% chez le rat), son administration a été réalisée par injection intrapéritonéale. De plus, il a été observé que le PF montre une rapide clairance (75 mL/min/kg), soulignant la réversibilité de ses effets (359).

Le premier groupe a reçu une dose à 10 mg/kg/dose tous les six heures pendant 24 heures, le second groupe a reçu 30 mg/kg/dose pendant la même durée. Dans les deux cas, la réduction d'expression du gène codant pour la *ER enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase* a atteint 80%. L'expression de gènes impliqués dans la synthèse d'acides gras ont été réduit de 50% et 75% dans le premier et deuxième groupe respectivement. La synthèse du cholestérol a également diminué de 50% dans le premier groupe, et 80% dans le deuxième (359).

Depuis 2008, le PF a été utilisé à des fins de recherche d'abord pour son effet inhibiteur des protéines SREBPs (360). Puis cette molécule a été décrite comme un anti viral contre les virus à ARN (361–363) et pour ses effets anti-cancéreux dans le cadre de cancer pancréatique (364), rénal (365) et hépatique (366). C'est son activité inhibitrice vis-à-vis de S1P, nécessaire à l'activation d'ATF6, qui a amené l'équipe à utiliser cette molécule.

Problématique de thèse

Dans la mucoviscidose, le canal Cl⁻ p.Phe508del-CFTR est codé par la mutation la plus fréquemment retrouvée chez les patients. C'est une protéine qui ne peut pas valider les étapes de contrôle qualité du RE, ce qui l'empêche de terminer sa maturation et d'atteindre la membrane plasmique. La mucoviscidose cause des réponses inflammatoires et infectieuses, la production d'espèces réactive à l'oxygène ou encore l'accumulation de protéines mal formées dans la lumière du RE, qui sont autant de facteurs déclencheurs de l'UPR.

Des études ont montré que l'activation d'ATF6, une des trois voies de régulation de l'UPR, menait à l'inhibition de la transcription de nombreux gènes dont le gène *cftr* (367,368). Ces études ont été le point de départ de mon projet de thèse. L'équipe avait utilisé des siARN dirigés contre ATF6 pour évaluer l'effet de l'inhibition de ce facteur de transcription sur le p.Phe508del-CFTR. Les résultats ont montré un effet bénéfique, avec notamment une augmentation d'expression totale et membranaire du p.Phe508del-CFTR se traduisant par une hausse des courants d'ions Cl⁻ due à l'activité du canal CFTR (105). Plus récemment, l'équipe a utilisé une molécule inhibitrice de la voie ATF6, avec des résultats prometteurs (369). En effet, il a été montré que la molécule PF-429242 (PF), un inhibiteur de sérine protéases spécifique de la S1P, permettait d'augmenter les efflux d'ions Cl⁻. Cette augmentation est en lien avec une augmentation d'expression du canal p.Phe508del-CFTR, dans des cellules bronchiques humaines homozygotes la mutation Phe508del (CFBE41o-) et transduites pour surexprimée le CFTR.

La première partie de ce projet de thèse est d'approfondir les résultats obtenus lors du premier article de l'équipe à avoir utilisé le PF. Le premier objectif est d'apporter des résultats imageant les effets bénéfiques de l'inhibition de la voie ATF6 via l'inhibition de la protéine S1P dans un modèle plus proche de la pathologie de la mucoviscidose, les CFBE41o- non transfectées, et de réaliser de la fonctionnalité sur le canal p.Phe508del-CFTR sur ces cellules et sur des cellules épithéliales bronchiques issues de patients homozygotes pour cette mutation. Le second objectif est d'identifier les effets de l'inhibition de la S1P sur la modulation de nombreux gènes connus pour être impliqués dans l'UPR. Le but étant de trouver des acteurs permettant d'expliquer les effets bénéfiques d'une telle inhibition.

Le deuxième objectif de cette thèse est d'apporter des explications sur le mécanisme moléculaire menant au transport du p.Phe508del-CFTR jusqu'à la membrane plasmique, dans le cadre de l'inhibition de la voie ATF6. Au vu des récents résultats parus qui montrent l'implication de la voie de l'UPS sur un tel transport, via notamment l'intervention d'acteurs moléculaires impliqués dans l'autophagie, nous avons commencé à décrypter quelques intervenants qui sont régulés suite à l'inhibition d'ATF6 et qui peuvent avoir un impact sur le transport du p.Phe508del-CFTR jusqu'à la membrane plasmique.

Résultats

I. Evaluation de l'effet de l'inhibition de la sérine protéase S1P sur la restauration des efflux d'ions Cl⁻ lié à l'augmentation d'expression du canal p.Phe508del-CFTR.

Introduction

La mutation Phe508del-CFTR est la plus fréquente chez les patients atteints de mucoviscidose. Elle produit une protéine incapable de valider les étapes de contrôle qualité du RE, restant ainsi séquestrée dans cet organiste et ne pouvant atteindre la membrane plasmique. Depuis plusieurs années, des solutions sont recherchées afin de trouver un moyen de restaurer le transport et l'activité du p.Phe508del-CFTR.

L'UPR, un mécanisme de défense vital pour le maintien de l'homéostasie globale des cellules, montre une activité importante à cause notamment des réponses inflammatoire et infectieuse présentes dans ce contexte pathologique. Des études ont montré que la voie ATF6 inhibait l'expression du gène *cftr*. Ainsi, au sein de notre équipe, nous avons commencé à étudier l'effet de l'inhibition de cette voie par des siRNA dans un premier temps, puis par des molécules pharmacologiques. Le PF est un inhibiteur de sérine protéase spécifique de l'enzyme S1P (MBTP1), une protéine centrale dans l'activation de la voie ATF6. Ici, nous montrons que l'inhibition de S1P est une cible thérapeutique intéressante pour restaurer l'expression du canal p.Phe508del-CFTR et les efflux d'ions Cl⁻ lié à son l'activité. Nous avons également mis en évidence dix gènes connus pour être impliqués dans l'UPR, dont l'expression était modulée après avoir inhiber S1P. Ces gènes peuvent être des cibles intéressantes à étudier afin de comprendre pourquoi l'inhibition de la S1P mène à ces effets positifs sur le p.Phe508del-CFTR.

Concernant les conditions de traitement, pour certaines expériences, la thapsigargine a été utilisée comme inducteur de l'UPR. Nous avons également testé le potentiel protecteur d'un traitement préventif avec le PF et ensuite en ajoutant la thapsigargine. Cela dans le but d'évaluer si le fait de bloquer l'activation d'ATF6 permettait de diminuer les effets d'une induction de l'UPR ultérieur. Nous avons également appliqué un traitement au VX-809 dans certains cas, afin de comparer ces effets avec ceux observés suite au traitement au PF, ou pour évaluer si des effets synergiques entre ces deux molécules pouvaient être observés.

Résultats

Dans un premier temps, après avoir montré que le PF n'était pas toxique pour nos cellules, nous avons vérifié si ce traitement n'engendrait pas d'inflammation en utilisant l'interleukine 8 comme marqueur. Une augmentation significative de l'expression de

l'interleukine 8 n'a été observée qu'après un traitement par le PF à 100 μ M, ce qui est dix fois la concentration apportée aux cellules dans la suite de nos expérimentations.

Nous nous sommes assuré que la localisation cellulaire d'ATF6 était modifiée après l'utilisation du PF par immunocytochimie. Ces expériences ont montré qu'ATF6 était absent des noyaux des cellules après traitement. Étant donné que la localisation d'ATF6 est dépendante de son clivage et donc de son état d'activation, cela signifie qu'il n'a pas été clivé par la S1P et n'a donc pas pu être relocalisé dans le noyau.

Ensuite, pour vérifier la spécificité du PF vis-à-vis de la S1P, nous avons réalisé des western blots afin d'évaluer le clivage de SREBP2. En effet, cette protéine est souvent utilisée comme marqueur concernant l'activité de la S1P et d'ATF6, car plus facilement détectable que cette dernière. En utilisant des échantillons enrichis en protéines nucléaires et après nous être assuré de l'enrichissement de ces dits échantillons, nous avons montré que SREBP2 n'est plus clivé dans des conditions de traitement au PF.

Les effets de l'inhibition de la S1P sur la modulation de l'UPR ont ensuite été étudiés. Tout d'abord nous avons mesuré l'expression de la Grp78, marqueur de l'activation de l'UPR. L'inhibition de la S1P réduit significativement l'expression de la Grp78, même en induisant l'UPR après un traitement au PF. Ensuite, nous avons évalué la production d'ARN messager d'autres effecteurs de l'UPR qui sont : PERK, CHOP, IRE1 α et XBP1. Aucun de ces effecteurs n'a montré de variation dans la production de leur ARNm associé après avoir inhibé la S1P.

Nous avons ensuite mesuré les efflux d'ions Cl⁻ lié à l'activité du canal p.Phe508del-CFTR par des expériences de *patch-clamp*. Nous avons évalué les effets du PF par rapport à ceux du VX-809. Nous avons montré que le PF augmentait significativement les efflux d'ions Cl⁻ lié à l'activité du p.Phe508del-CFTR, une augmentation même plus forte que celle retrouvée avec le VX-809. Nous n'avons cependant pas remarqué d'effet synergique entre les deux traitements. Nous avons ensuite confirmé ces résultats en réalisant des expériences de chambre de Ussing sur des cellules épithéliales bronchiques issues de patients atteints de mucoviscidose et homozygote pour la mutation Phe508del-CFTR.

Pour chercher à connaître l'origine de l'augmentation de ces courants ioniques, nous avons mesuré l'expression globale du CFTR en réalisant des immunoprécipitations. Ces expériences ont montré une hausse de l'expression de la bande B du CFTR après traitement au PF dans les CFBE41o- transduite pour surexprimer le p.Phe508del-CFTR ou non. Nous avons également remarqué que l'association du PF et du VX augmentait l'expression globale du CFTR. Nous avons confirmé ces résultats en vérifiant que la bande B du CFTR était surexprimée en réalisant des expériences de résonance plasmonique de surface. Enfin, pour être sûr que l'augmentation des efflux d'ions Cl⁻ lié à l'activité du p.Phe508del-CFTR était bien due à sa surexpression, nous avons étudié son expression membranaire. En utilisant des échantillons

enrichis en protéines membranaires, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'expression membranaire de la bande B du CFTR après inhibition de la S1P.

Pour expliquer le mécanisme globale menant à ces effets positifs sur le p.Phe508del-CFTR, nous avons réalisé un screening sur 84 gènes connus pour être impliqués dans l'UPR, afin de connaître ceux qui seraient modulés après l'inhibition de la S1P. Parmi ceux étant surexprimés, sept gènes sont ressortis : *HSPA1B*, *CEBPB*, *VIMP*, *PFDN2*, *MAPK8*, *XBP1* et *PPP1R15A*. Pour ceux étant sous-exprimé, nous avons détecté trois gènes : *INSIG1*, *CALR/CRT* et *HSPA5*.

Discussion

Nous avons montré que l'inhibition d'ATF6 par le blocage des effets de la S1P réduisait la mise en place de l'UPR. Cela a pour conséquence de réduire potentiellement l'induction de l'ERAD et donc de limiter la dégradation du p.Phe508del-CFTR, lui laissant alors le temps de pouvoir être exporté hors du RE jusqu'à la membrane plasmique. Son expression globale et membranaire étant augmentées via l'inhibition d'ATF6, nous avons montré ici que l'inhibition de la S1P est une cible thérapeutique intéressante permettant de restaurer les efflux d'ions Cl⁻ lié à l'activité du p.Phe508del-CFTR.

Pour aller plus loin, nous avons mis en évidence dix gènes impliqués dans l'UPR qui sont modulés suite au traitement au PF. Parmi eux les pistes les plus intéressantes sont HSPA1B, CEBPB, XBP1, MAPK8 et CRT. En effet, HSPA1B est une protéine chaperon aidant les protéines mal repliées à retrouver leur conformation tridimensionnelle viable. CEBPB est un facteur de transcription qui a montré avoir un effet sur l'expression du CFTR. CRT est une protéine composant le complexe CNX/CRT, qui est un point central dans les étapes de contrôle qualité, et dont l'expression a montré des effets néfastes sur le p.Phe508del-CFTR. Enfin, XBP1 et MAPK8 (également appelé JNK1) pourraient jouer un rôle non négligeable sur le transport non conventionnel du p.Phe508del-CFTR. En effet, ces deux acteurs sont régulés par l'activité de IRE1 α , et il a été montré que cela avait un lien avec la mise en place de l'autophagie et plus particulièrement dans l'expression et l'activation de composés impliqués dans l'UPS, permettant d'amener le p.Phe508del-CFTR jusqu'à la membrane plasmique. Ce sont donc des cibles intéressantes qui pourraient être étudiées par la suite, afin d'expliquer le mécanisme moléculaire se cachant derrière les effets bénéfiques apportés par l'inhibition de la S1P.

L'inhibition de la S1P semble donc être une cible thérapeutique intéressante dans le cadre de la mucoviscidose au vu des effets positifs observés sur le canal p.Phe508del-CFTR. Un autre but découlant de ces résultats est de découvrir d'autres molécules plus efficaces que le PF, ou qui montrent des effets synergiques avec ce dernier ou avec les traitements déjà existants. Quatre nouvelles molécules analogues au PF ont vu le jour au sein de l'équipe. Une

d'entre elle a déjà été testée dans notre modèle cellulaire. Elle n'a montré aucune toxicité ainsi que des effets similaires sur le p.Phe508del-CFTR à ceux observés avec le PF. Réaliser les mêmes processus expérimentaux sur ces molécules que ceux utilisés pour le PF, ainsi qu'évaluer leur efficacité entre eux et les traitements déjà prescrits, pourrait amener des solutions thérapeutiques supplémentaires aux patients atteints de mucoviscidose.

The Inhibition of the Membrane-Bound Transcription Factor Site-1 Protease (MBTP1) Alleviates the p.Phe508del-CFTR Defects in Cystic Fibrosis Cells

Raphaël Santinelli ¹, Nathalie Benz ¹, Julie Guellec ¹, Fabien Quinquis ¹, Ervin Kocas ¹, Johan Thomas ¹, Tristan Montier ¹, Chandran Ka ¹, Emilie Luczka-Majerus ², Edouard Sage ³, Claude Férec ¹, Christelle Coraux ² and Pascal Trouvé ^{1,*}

¹ Univ Brest, Inserm, EFS, UMR 1078, 22 avenue Camille Desmoulins, F-29200, Brest, France.
² Inserm UMR-S 1250, University of Reims Champagne-Ardenne (URCA), SFR Cap-Santé, Reims, France
³ Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, VIM, Jouy-en-Josas, France
 * Correspondence: pascal.trouve@inserm.fr; Tel.: +33 (0)2.98.01.82.17

Abstract: Cystic Fibrosis (CF) is due to mutations in the CFTR gene, the most frequent variant being p.phe508del. The CFTR protein is a chloride (Cl⁻) channel which is defective and almost absent of cell membranes when the p.Phe508del mutation is present. The p.Phe508del-CFTR protein is retained in the endoplasmic reticulum (ER) and together with inflammation and infection triggers the Unfolded Protein Response (UPR). During UPR, the Activating Transcription Factor 6 (ATF6) is activated by cleavage and then decreases the expression of p.Phe508del-CFTR. We have previously shown that the inhibition of the activation of ATF6 alleviates the p.Phe508del-CFTR defects in cells overexpressing the mutated protein. In the present paper, our aim was to inhibit the cleavage of ATF6 and thus its activation in a human bronchial cell line with endogenous p.Phe508del-CFTR expression and in bronchial cells from patients, to be more relevant to CF. This was achieved by inhibiting the protease MBTP1 which is responsible for the cleavage of ATF6. We show here that this inhibition leads to increased mRNA and p.Phe508del-CFTR expression and consequently to increased Cl⁻ efflux. We also explain the mechanisms linked to these increases by the modulation of genes when MBTP1 is inhibited. Indeed, RT-qPCR assays show that genes such as HSPA1B, CEBPB, VIMP, PFND2, MAPK8, XBP1, INSIG1 and CALR are modulated. In conclusion, we show that the inhibition of MBTP1 has a beneficial effect in relevant models to CF and that this is due to the modulation of genes involved in the disease.

Keywords: Cystic Fibrosis; p.Phe508del-CFTR; MBTP1; ATF6

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date
 Revised: date
 Accepted: date
 Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cystic Fibrosis (CF) is the most common lethal autosomal recessive disease in the European population. It is mainly characterized by pulmonary disorders and is due to a large panel of mutations in the *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)* gene affecting the CFTR protein synthesis and activity [1, 2]. The CFTR protein is an N-glycosylated transmembrane protein, member of the ABC transporter family [3, 4]. Electrophoretic analysis shows that CFTR exists in three different forms of 130, 135 and 150 kDa referred as band A, B and C, respectively [5]. These bands represent the different glycosylation forms of CFTR. Band A is the non-glycosylated form, band B is the core-glycosylated CFTR and band C is the mature form of CFTR with complex glycosylation [4]. The glycosylation state of CFTR is thus representative of its maturation and is an important marker of its processing and function as a cAMP-activated, phosphorylation-regulated Cl⁻ channel, responsible for the transport of chloride (Cl⁻) and bicarbonate anions

[2,3,6]. In links with the Epithelial Sodium Channel (ENaC) it maintains a proper hydration of the mucus [7].

The most frequent mutation in CF is a phenylalanine deletion at position 508 of the polypeptide sequence (p.Phe508del) [5, 8]. This deletion alters the folding of the protein (p.Phe508del-CFTR) which is retained within the Endoplasmic Reticulum (ER) cannot be validated by the quality control of the ER and is rapidly degraded by the Endoplasmic Reticulum Associated Degradation (ERAD) [8, 9]. p.Phe508del-CFTR remains in a core-glycosylated form and only a negligible amount reaches the plasma membrane of the cells [10, 11]. The consequence in the lung, together with a lost inhibition of ENaC, is a more viscous mucus that diminishes the mucociliary clearance and enables pathogens to develop, inducing chronic infections and inflammation [12,13]. The subsequent altered lung function is the main cause of morbidity and mortality in CF.

Inflammation, infection and the retention of misfolded proteins within the ER are cellular stressors triggering the Unfolded Protein Response (UPR) [14,15]. The UPR is a normal physiological recovery process aimed to regulate the protein load in the ER and to alleviate the cellular stress. The 78 kDa glucose-related protein/Binding-immunoglobulin protein (Grp78/BiP) activates the UPR by its binding to the unfolded protein [16, 17]. This binding leads to its dissociation from three main effectors which are Inositol-Requiring Enzyme 1 α (IRE1 α) [18], Protein kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK) [19] and Activating Transcription Factor 6 (ATF6) [20, 21]. These effectors then activate the transcription of genes encoding molecular chaperones, folding catalysts and proteins involved in the ERAD. They also decrease the global synthesis of proteins in order to avoid an overload of the ER [16, 22]. ATF6 (90 kDa) allows the transcription of chaperones, of proteins related to misfolded proteins degradation and of the cholesterol metabolism but it also decreases the expression of some genes such as *CFTR* [23, 24]. When GRP78 dissociates, ATF6 migrates and anchors in the membranes of the Golgi apparatus where it is successively cleaved by MBTP1 and 2, that cleave the lumen section of ATF6 and the juxta-membrane region at the cytosol side, respectively [20, 25, 26]. The cleaved form of ATF6 (50 kDa) is subsequently released into the cytosol and migrates to the nucleus where it acts as a transcription factor [24, 27, 28]. Whereas ATF6 negatively regulates the expression of *CFTR*, we showed that its inhibition using siRNA in transfected A549 cells expressing p.Phe508del-CFTR restores the Cl⁻ flux, making of ATF6 a potential therapeutic target for CF [29–32]. More recently, we inhibited the cleavage of ATF6 in CFBE41o- cells transduced to overexpress p.Phe508del-CFTR and found that this inhibition also alleviates the defects due to the mutation in these cells [33].

In the present study, we inhibited MBTP1 and thus the cleavage and activation of ATF6 to alleviate p.Phe508del-CFTR defects, in a non-transduced Human Bronchial Cell line and in bronchial epithelia from patients, to be as close as possible to the physiopathology of CF, in a relevant cell model. Indeed, these non-transduced CF cells freed us from possible biases due to the *CFTR* transduction, with respect to UPR triggering. Furthermore, we assessed the effects of the inhibition of MBTP1 in human bronchial epithelia from CF patients, what has never been performed before. We found that this inhibition increases the p.Phe508del-CFTR's expression and the Cl⁻ efflux, due to an augmented presence of the core-glycosylated form of *CFTR* in the membranes of the cells. In order to explain how the inhibition of MBTP1 acts upon Cl⁻ efflux, we performed RT-qPCR-Arrays and highlighted that the *HSPA1B*, *CEBPB*, *VIMP* and *Calreticulin (CALR)* genes are the main genes involved in the alleviation of the p.Phe508del-CFTR's defects in our models.

In conclusion, we showed that the protease MBTP1 is a potential target against CF.

2. Material and Methods

2.1. Cell Culture and Protein Extraction

The native CFBE41o- cells and the transduced CFBE41o- cell lines (CFBE41o/corrected (corr) and CFBE41o-/F508del) were cultured, as previously described [[34]]. These

cells are human bronchial epithelial cells, derived from a CF patient homozygous for the p.Phe508del mutation and immortalized with a SV40 plasmid (pSVori-) [[34], [35]]. Cells were obtained from the Cystic Fibrosis Foundation (USA). In some experiments, cells were treated with PF-429242 (PF) that specifically inhibits MBTP1[[36]] (10 μ M for 48 hours; SML0667, Sigma-Aldrich) and/or with thapsigargin (0.5 μ M for 4 hours; #10798352, Acros Organics) to induce UPR and/or with VX-809 (3 μ M for 48 hours; S1565, Selleckchem).

For protein extraction, cells were washed with cold PBS X1 and lysed in RIPA buffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Na-Deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM iodoacetamide, 100 mM PMSF; pH=7.5) in the presence of the Complete Protease Inhibitor Cocktail (PI; 40 μ L/mL, Complete tablets EDTA free, Roche).

For Ussing chamber experiments, Human airway epithelial cells were obtained from the department of thoracic surgery and lung transplantation of the Foch hospital (Suresnes, France).

2.2. Nuclear Extract Preparation

Cells were washed twice with cold PBS 1X, scrapped in the presence of PI and centrifuged (5 min, 1000g, 4°C). The pellets were suspended in Lysis buffer (0.3M Sucrose, 1mM Sodium azide, Hepes 20mM; pH=7.2) in the presence of PI before 10 min incubation on ice. Lysates were centrifuged (10 min, 2000g, 4°C) and pellet were suspended in RIPA buffer with PI. Lysates were centrifuged (10 min, 800g, 4°C) and pellets were suspended in NaI8 buffer (0.1M NaCl, 8X Sucrose, 30mM Imidazole) with PI.

2.3. Membrane Extract Preparation

Cells were washed twice with cold PBS 1X, scrapped in the presence of PI and centrifuged (5 min, 1000g, 4°C). The pellets were suspended in Lysis buffer (1mM EDTA, Hepes 10mM; pH=7.2) with PI before 10 min incubation on ice. Mechanical lysis was performed using Dounce homogenizer (Kontes Glass Company, New Jersey) with 8 back and forth. Sucrose buffer was added (500mM Sucrose, Hepes 10mM; pH=7.2) and further 8 back and forth were performed. Lysates were centrifuged (10 min, 6000g, 4°C) and supernatant was ultracentrifuged (30 min, 100.000g, 4°C). Pellets were suspended in NaI8 buffer with PI.

2.4. Immunoprecipitation

After protein extraction, lysates (700 μ g protein) were subjected to a pre-clearing steps with magnetic beads (Immunoprecipitation Kit - Dynabeads™ Protein G, Invitrogen) for 2 hours at 4°C. Supernatant was incubated with 2 μ g anti-CFTR antibody (24-1 clone, Novus Biologicals) overnight at 4°C. Antibody-Antigen complex was incubated with the magnetic beads for 3 hours at 4°C, then washed 3 times. In order to load the complex on SDS-PAGE, 2X Laemmli Sample Buffer plus β -mercaptoethanol was added on the Bead-Antibody-Antigen complexes before heating at 75°C for 10 min.

2.5. Cell Viability in the Presence of the MBTP1 Inhibitor

Viability of the cells after treatment was measured by a colorimetric MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide) test (MTT kit, Millipore), according to the manufacturer's instructions. In brief, CFBE41o- cells were cultured in a 96-wells plate and treated with PF. After the treatment, WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) was added in the wells and incubated for 4 hours in a humidified incubator (37°C, 5% CO₂). WST-8 was reduced to an orange formazan product directly proportional to the number of living cells, which were detected by measuring the absorbance at 450 nm. The percentage of viability of the cells exposed to the MBTP1 inhibitor was determined comparing their absorbance with the one of untreated cells (100% of viability).

2.6. Western Blotting

Cell lysates were centrifuged (15 min, 16000g, 4°C) and protein concentrations were determined by the Lowry's methodology. Samples were subjected to SDS/PAGE and transferred onto membranes which were then incubated with anti-GRP78 antibody (NBP1-06274, Novus Biologicals), anti-ATF6 antibody (MAB6762 clone 1-7, Abnova), anti-SREBP2 (#7076, Cell Signaling), anti-aldolase antibody (ab169544, Abcam), anti-Histone H1 antibody (sc-8030 AE-4, Santa Cruz Biotechnology), anti-CFTR antibody (596, US Cystic Fibrosis Foundation), anti-CFTR antibody (24-1 clone, Novus Biologicals), anti-NaK-ATPase antibody (ab76020, Abcam), anti-Actin-HRP (sc-47774, Santa Cruz Biotechnology). Densitometric measurements were performed by Image Studio Lite software (Version 5.2) and signals were normalized by the house-keeping genes.

2.7. Immunofluorescence

Cells were cultured in Nunc Lab-Tek II Chamber Slide System™. After 48 hours, cells were permeabilized by paraformaldehyde 4% at room temperature. Nonspecific binding sites were saturated with BSA (3%, 2 hours). Incubations were performed with the ATF6 primary antibodies (1:500; Merck-Millipore, 09-069) and with the anti-PDI antibody (1:1000, Thermo Fisher Scientific, MA3-018). The fluorophore-tagged secondary antibodies were Alexa Fluor 488® (1:400; Jackson Immunosearch, AB2313584) and Cyanine 3 (1:400; Jackson Immunosearch, AB2338680). Nuclear counterstain was done by Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories). Images were obtained with a Zeiss Imager M2 microscope and an Axiocam 503 (Carl Zeiss).

2.8. RNA Extraction and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA from untreated and treated cells were extracted using NucleoSpin RNA plus columns (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's instructions. 400 ng to 1 µg of total RNA were used for the cDNA synthesis. Reverse transcription was performed with the SuperScript® II reverse transcriptase (Invitrogen). PCR were performed with a HotStarMastermix (Qiagen). Primers were for IRE1α, forward: 5'- gaaaaggaatccctggatgg and reverse: 5'- tcagaggcgctctggagtc; for XBP1, forward: 5'- cagcgttggggatggatgc and reverse: 5'- gggcttggtatataatgtgg; for PERK, forward: gactacataggactcagtc5'- and reverse: agatgctcctccttcttac 5'-; for CHOP, forward: aatgggggtacctatgtttcac 5'- and reverse: cggtaactcagagctcgg 5'-; for Actin, forward: 5'- gttgctatccagctgtg and reverse: 5'- cactgtgttg-gctacag. The thermal cycling conditions were 95°C for 15 minutes followed by 40 cycles at 94°C for 30 seconds, 61°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute and a final extension at 72°C for 10 minutes. The housekeeping β-actin genes were used as a control. The PCR products were resolved using a 1% agarose gel prestained with BET and visualized under UV light. The intensities of the bands were determined by densitometry using the ImageJ software. β-actin normalization was performed. Statistical analysis was performed with at least three independent experiments.

The expression of p.Phe508del-CFTR in the presence and without PF, was analyzed by real-time PCR (LightCycler 480, Roche). The synthesized cDNA was mixed with 1X SYBR Green Master Mix (Qiagen) and 10µM of either the specific CFTR's primers (FW 5'- atgccttcggcgatgtttt, reverse: 5'- tgattctcccagtaagagagc) or the β-Actin primers. The Real-time PCR cycling conditions were as following: PCR enzyme activation step at 95°C for 15 minutes, 45 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 57°C for 30 seconds, extension at 72°C for 30 seconds. All conditions were normalized relative to the β-Actin control transcript. The results were analyzed using the 2-ΔΔCt method.

2.9. Patch-Clamp

Patch-clamp experiments were performed with an automatic electrophysiology workstation (Port-a-Patch, Nanion Technologies GmbH) coupled to an external amplifier unit HEKA EPC-10 [[37], [38]]. Whole-cell recordings were performed with treated or non-

treated cells with the MBTP1 inhibitor. All measurements were obtained at room temperature. The voltage clamp protocol was carried out between -80 to +80 mV (10 mV per steps) with a holding membrane potential of -80 mV. The following buffer were used to suspend the cells: 140 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes (pH 7.4), 5 mM D-glucose monohydrate, 298 mOsm. The internal buffer was: 50mM CsCl, 10 mM NaCl, 60mM Cs-Fluoride, 20mM EGTA, 10mM Hepes/CsOH, 5mM Mg-ATP; pH 7.2; 285mOsmol. CFTR's activators (forskolin, 10 μ M and genistein, 30 μ M; Sigma Aldrich) and inhibitor (CFTRinh172, 10 μ M; Sigma Aldrich) were added to activate or inhibit its activity, respectively.

2.10. Surface Plasmon Resonance (SPR)

SPR was used to estimate the total amount of the p.Phe508del-CFTR protein in CFBE41o- cells before and after treatment, because the expression is too low to be detected by western blot. We studied the expression of the fully glycosylated form of CFTR (Band C) in untreated and MBTP1 inhibitor treated cells, according to the previously described method [39]. Real-time detection of the Band C of CFTR in cell lysates was performed using a Biacore system (Biacore 3000, GE Healthcare) and its Control Software version 3.2. Injections were performed at 25 °C in HBS-P 1 \times running buffer (GE Healthcare), at a flow of 5 μ l/min. Sensorgrams were analyzed using the BIAevaluation software. For each sample the indicated RU value is the value on the active flow cell (FC) minus the value of the reference FC, 20 seconds after the beginning of the dissociation phase. In brief, the experiments were performed in a « sandwich » format, as following: the CFTR antibody (M3A7, Merck) was covalently linked onto a CM5 sensor chip according to Biacore recommendations, in order to reach 6000 Resonance Units (RU). Various quantities (0.5 to 10 μ g) of cell lysates were injected over the antibody to determine which quantity was necessary to obtain the saturation of the antibody. When the anti-CFTR antibody was saturated by the CFTR present in the cell lysates, Wheat Germ Agglutinin (WGA, Triticum vulgare, Calbiochem) was injected and the RU values were recorded 20 seconds after the beginning of the dissociation phase. These RU values were used to compare the relative amount of the band C in the samples. The opposite experiment in which WGA was linked onto the sensor chip (9000 RU) and the anti-CFTR was used to detect CFTR was performed. Negative controls were performed using an irrelevant protein. Samples from 3 different cultures for each condition were analyzed in triplicate.

2.11. Gene Expression Analysis by mRNA Array

Total RNAs were extracted from treated and untreated cells using a RNeasy Mini Kits (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Purity of the RNA was analyzed by the measurement of the 260/280 absorbance with a nanodrop. cDNA was produced from 500 ng of total RNA using RT² First Strand Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Gene expression analysis was performed with the RT² ProfilerTM PCR Array Human Unfolded Protein Response kit (96-Well Format, PAHS-089Z, Qiagen), using a LightCycler480 (Roche). Supplier protocol was followed for the use of the RT²SYBR Green ROX qPCR Mastermix (Qiagen 330520). Each real-time quantitative PCR (qPCR) plate contains primers specific to 84 genes previously implicated in the UPR, housekeeping genes and appropriate controls. RT2 Profiler PCR Array Data Analysis was performed according to the manufacturer's instructions. Differential gene expression was calculated as fold difference using the $\Delta\Delta$ Ct method. Fold difference was based on normalization using the average of the 3 most stable housekeeping genes (HKG; GAPDH, ACTB and B2M). For each of the 84 genes of interest (GOI), the Δ Ct value was calculated as Δ Ct = CtGOI / CtHKG. The relative fold change in expression was calculated as $2^{-\Delta\Delta$ Ct}. A threshold of 4 fold changes was chosen for the overexpressed genes. The threshold was

of 2 for down-regulated genes. Differentially expressed genes were submitted to a bibliographic analysis and only the genes with a described or possible link to CFTR are presented here.

2.12. Ussing Chamber Recordings

Human tissues from three donors (p.Phe508del/p.Phe508del) were collected and used. Bronchi were incubated in the presence of antibiotics (ceftazidime, 100 µg/ml; vancomycin, 100 µg/ml; tobramycin, 80 µg/ml; Meropenem, 8 µg/ml; amphotericin B 0.25 µg/ml), cleaned, opened and stored in RPMI-HEPES (plus antibiotic cocktail at 4°C). They were then incubated twice for 5 min in RPMI-Hepes containing DTT (130 mg/250 ml) to remove mucus, then rinsed 3 times in RPMI-Hepes. They were then incubated overnight at 4°C in 9 ml RPMI/HEPES containing 0.05% (W/V) pronase E and the antibiotic cocktail. After shaking in the presence of pronase E, the bronchi were transferred to a second tube in which 1 ml SVF was added to the supernatant (X4). The bronchi were then discarded and the 4 supernatants were pooled and centrifuged (5 min, 1200 rpm). The pellet was resuspended in 10 ml PneumaCult and cells were counted using an automatic counter or a Malassez cell. Cells were then seeded in Petri dishes (10cm, 1M cells, P0), previously coated with collagen IV in PneumaCult, in the presence of antibiotics. The medium was changed daily. Amphotericin B and antibiotics were removed after 4-5 days of culture. At confluence, cells were rinsed in PBS/EDTA, trypsinized, counted and centrifuged (5 min, 1200 rpm). 3 plates (control cells, cells treated with the inhibitor for 24 hours and cells treated with the inhibitor for 48 hours) of 6 Snapwells clear (0.4µm pore size, 12 mm diameter) previously coated with collagen IV were seeded (0.1M cells) in PneumaCult Ex medium for de Ussing chamber measurements. Inserts containing the 3 pseudo-epithelia were then mounted in a Ussing chamber system (Physiologic Instruments, USA) composed of two hemi-chambers filled with (in mM): 1.2 NaCl, 115 Na-gluconate, 25 NaHCO₃, 1.2 MgCl₂, 4 CaCl₂, 2.4 KH₂PO₄, 1.24 K₂HPO₄, 10 mannitol (pH 7.4) for apical solution and 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 1.2 MgCl₂, 1.2 CaCl₂, 2.4 KH₂PO₄, 1.24 K₂HPO₄, 10 glucose (pH 7.4) for basal solution. Apical and basal solutions were maintained at 37°C and gassed with 95% oxygen–5% CO₂. Short-circuit currents (I_{sc}) were measured.

2.13. Interleukin 8 (IL-8) Release

Epithelia were reconstituted with cells isolated from homozygous p.Phe508del CF patients (MucilAir™-CF; Epithelix, Switzerland). MucilAir™ is a reconstituted human 3D epithelium from airways surgical pieces. Cultures were performed at the air-liquid interface and the mature MucilAir™ was composed of basal cells, ciliated cells and mucus cells. The release of IL-8 was measured using ELISA assay (BD Biosciences 555244; detection: 3-200 pg/mL) in the basolateral medium of cells exposed to MBTP1 inhibitor (5, 50 and 100 µM), according to the manufacturer's instructions. Each ELISA plate contained a standard curve. Absorbance was measured at 450 nm and the results were normalized to a 24 hours secretion. The positive control of inflammation was Cytomix (0.2 mg/ml LPS, 500 ng/ml TNFα, 1 % FBS).

2.14. Statistical Analysis

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Differences between experimental groups were evaluated by a two-tailed unpaired Student's t test and were considered statistically significant when p<0.05 (*); p<0.01 (**); and p<0.001 (***). GraphPad Prism 6.01 software was used.

3. Results

3.1. Cell Viability and Inflammatory Response

The CFBE41o- cells viability after treatment with the MBTP1 inhibitor was assessed using a MTT test and as previously described, cell viability was not significantly altered

by the drug (10 μ M, 48 hours) [33]. IL-8 release was assessed in reconstituted human 3D epithelium from airways surgical pieces when 0, 5, 50 and 100 μ M PF were applied. As shown in Fig.1, A significant inflammatory response was observed at 100 μ M PF which was 10 times more than what was used in the experiments.

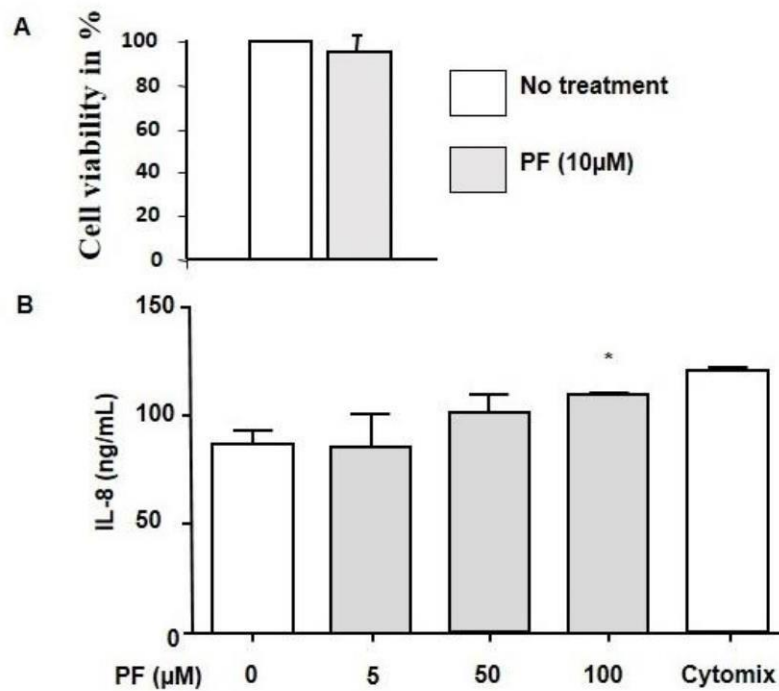


Figure 1. Assessment of the cell viability and the inflammatory response due to MBTP1 inhibition in native CFBE41o- cells and in epithelia from CF patients, respectively. A. Viability was assessed in CFBE41o- cells using a MTT test. No significant decreased viability was observed in the presence of 10 μ M PF, for 24 hours. B. IL-8 secretion was evaluated in epithelia from CF patients after different concentration of PF (0,5 μ M, 50 μ M, 100 μ M; n=3). Cytomix was used as a positive control of inflammation. The bar graph represents the statistical analysis after ELISA assay and indicates that the inhibition of MBTP1 has a significant effect on IL-8 secretion only at 100 μ M of treatment condition.

3.2. MBTP1 Inhibition Inactivates ATF6 and SREBP2 in CFBE41o- Cells

The effect of the inhibition of MBTP1 upon the activation of ATF6 was studied by immunofluorescence, using an anti-ATF6 antibody. The labeling of PDI was used to delimit the ER and DAPI was used to label the nuclei. Before PF treatment (Fig. 2A) ATF6 was observed within the nucleus of the cells (upper image), PDI was observed around the nucleus in the ER (middle image). The merge image (lower image) indicated that ATF6 is mostly present in the nucleus, as well as in the ER of the cells. After treatment (Fig. 2B), the localization of ATF6 was modified. As shown in the upper image, ATF6 was no longer visible in the nuclei. Instead, it was co-localized with PDI (middle image), indicating that

the treatment maintained ATF6 in the ER, in an uncleaved and inactive form (lower image).

315

316

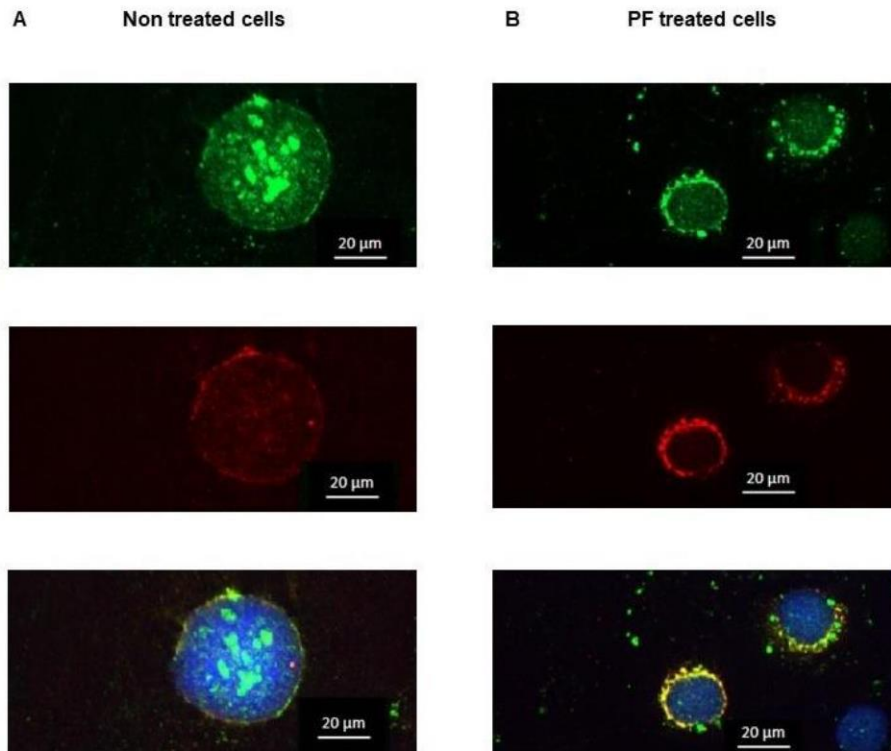


Figure 2. Localization of ATF6 in response to MBTP1 inhibition in native CFBE41o- cells. Immunofluorescence was used to assess the localization of ATF6 before and after treatment by PF. A. In the absence of treatment, ATF6 is in the nuclei of the cells (upper image). The middle image is the labeling of the ER by PDI. In the lower image which is a merged image of ATF6 and PDI, it can be observed that ATF6 is mainly located in the nuclei which is a hallmark of the UPR triggering. B. When MBTP1 is inhibited, ATF6 is observed around the nuclei (upper image). The middle image is the labeling of the ER by PDI. In the lower image which is a merged image of ATF6 and PDI labeling, it can be observed that ATF6 is mainly located around the nuclei and is co-distributed with PDI. Therefore, the inhibition of MBTP1 retains ATF6 in the ER which is a hallmark of its non-activation. Each labelling was performed 8 times and images are representative of 150-200 cells by field.

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

SREBP2 is a protein which is translocated to the nuclei of the cells after its cleavage by MBTP1 and is used as a marker of the inhibition of MBTP1 and thus, of the cleavage of ATF6 which is more difficult to detect due to its low expression and to the poor specificity of the commercially available antibodies. Because the activated form of SREBP2 is in the nuclei, we used nuclei enriched samples. As shown in Fig. 3, the cytosolic protein aldolase was present in cytosolic fraction (lane 1) and in total protein fraction (lane 6). Its expression was lower in nuclei enriched fractions (lanes 2 to 5). In the presence of the UPR triggering drug thapsigargin, aldolase expression was increased (lane 4) as previously described, indicating the efficiency of the drug [40]. This expression of aldolase was de-

328

329

330

331

332

333

334

335

336

creased in the presence of the MBTP1 inhibitor (lane 5) suggesting that the increased expression of aldolase when UPR is triggered is under the dependence of ATF6. To further show the nuclei enrichment of our samples, the nucleic protein histone H1 was detected. It was almost absent of the cytosolic and total protein fractions. It was mostly detected in the nuclei enriched samples. The pattern of the detection of aldolase and histone H1 ensured that samples aimed to detect SREBP2 were indeed enriched in nuclear proteins. Western blots using samples enriched in nuclei (lanes 2 to 5) showed that SREBP2 was absent in the presence of PF (lanes 3 and 5) while it was, even very slightly, observed in the presence of thapsigargin or without any treatment (lanes 2 and 4). Therefore, the inhibition of MBTP1 was obtained even when the UPR was induced in the cells by thapsigargin.

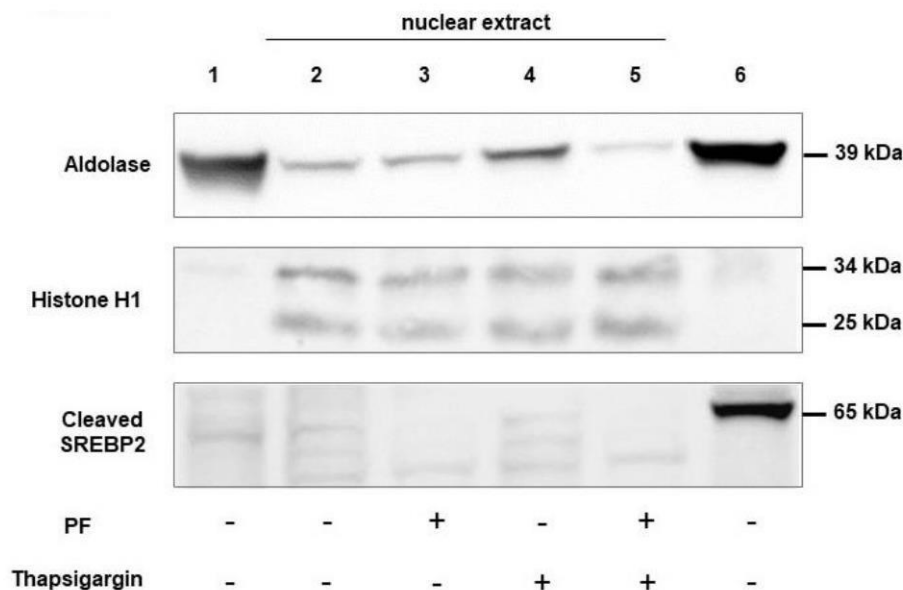
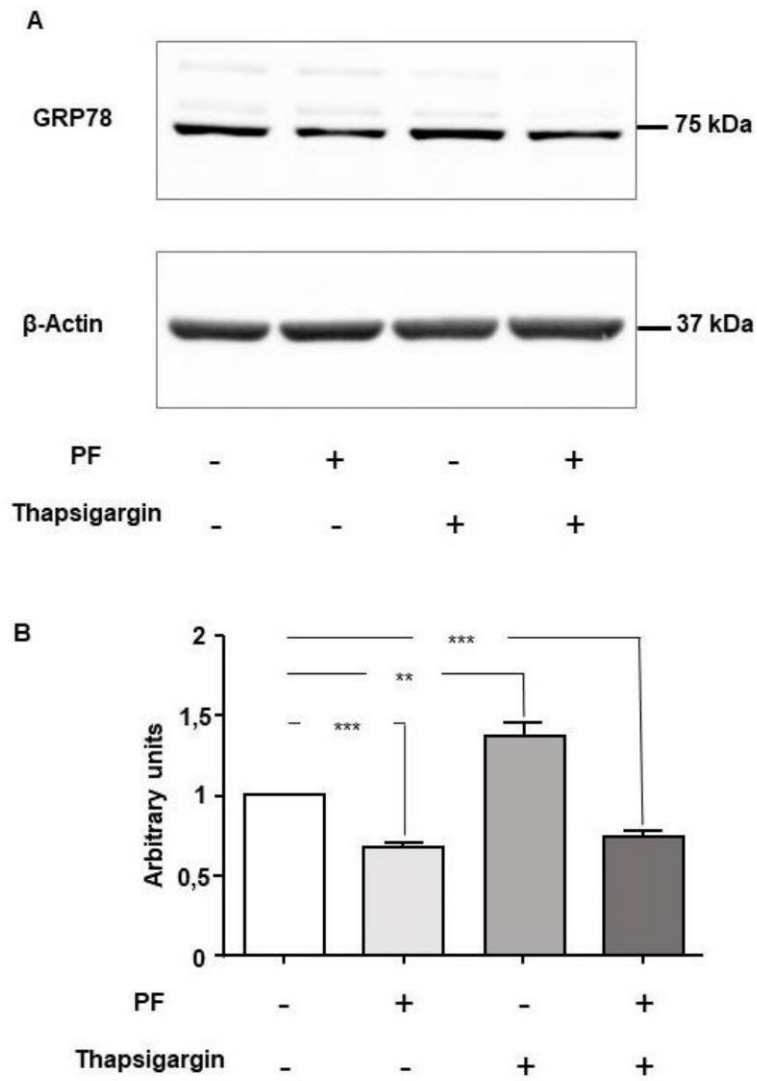


Figure 3. Localization of SREBP2 in response to MBTP1 inhibition in native CFBE41o- cells. The localization of SREBP2 was assessed by western blot in cytosolic extract (lane 1), nuclei enriched samples (lanes 2 to 4) and total lysate lane (6). To ensure the enrichment in nuclear proteins, aldolase was used as cytosolic marker (upper panel) and Histone H1 as nuclear marker (middle panel). SREBP2 cleaved form (lower panel) was absent in nuclear extract of treated cells indicating that its cleavage was abolished.

3.3. MBTP1 Inhibition Does Not Trigger the UPR in CFBE41o- Cells

The main marker of the triggering of the UPR is the overexpression of its sensor Grp78. Therefore, we assessed its expression after MBTP1 inhibition. Proteins from non-treated, PF treated, thapsigargin treated and PF plus thapsigargin treated cells were loaded on gels. Thapsigargin was used to trigger the UPR and the PF plus thapsigargin condition was used to assess a putative protection of the MBTP1 inhibitor against the UPR. As shown in Fig. 4A, the inhibition of MBTP1 decreased the expression of Grp78, in all conditions, with or without thapsigargin. The lower image shows the detection of actin which was used to normalize the signals for the statistical analysis. The results of the statistical analysis are presented in Fig. 4B. When MBTP1 was inhibited, the expression of Grp78 was significantly decreased when compared to non-treated cells and to cells in which UPR was triggered. The expressions of the effectors of the UPR, namely CHOP,

IRE1, PERK and XBP1 were studied by conventional PCR. As shown in Fig. 4C, the mRNA of IRE1, PERK and CHOP were expressed in non-treated cells as well as in treated cells. No significant difference in the expression of the mRNA of CHOP, IRE1, PERK and XBP1 was observed in the absence or in the presence the MBTP1 inhibitor and was confirmed by the statistical analysis (Fig. 4D).



372

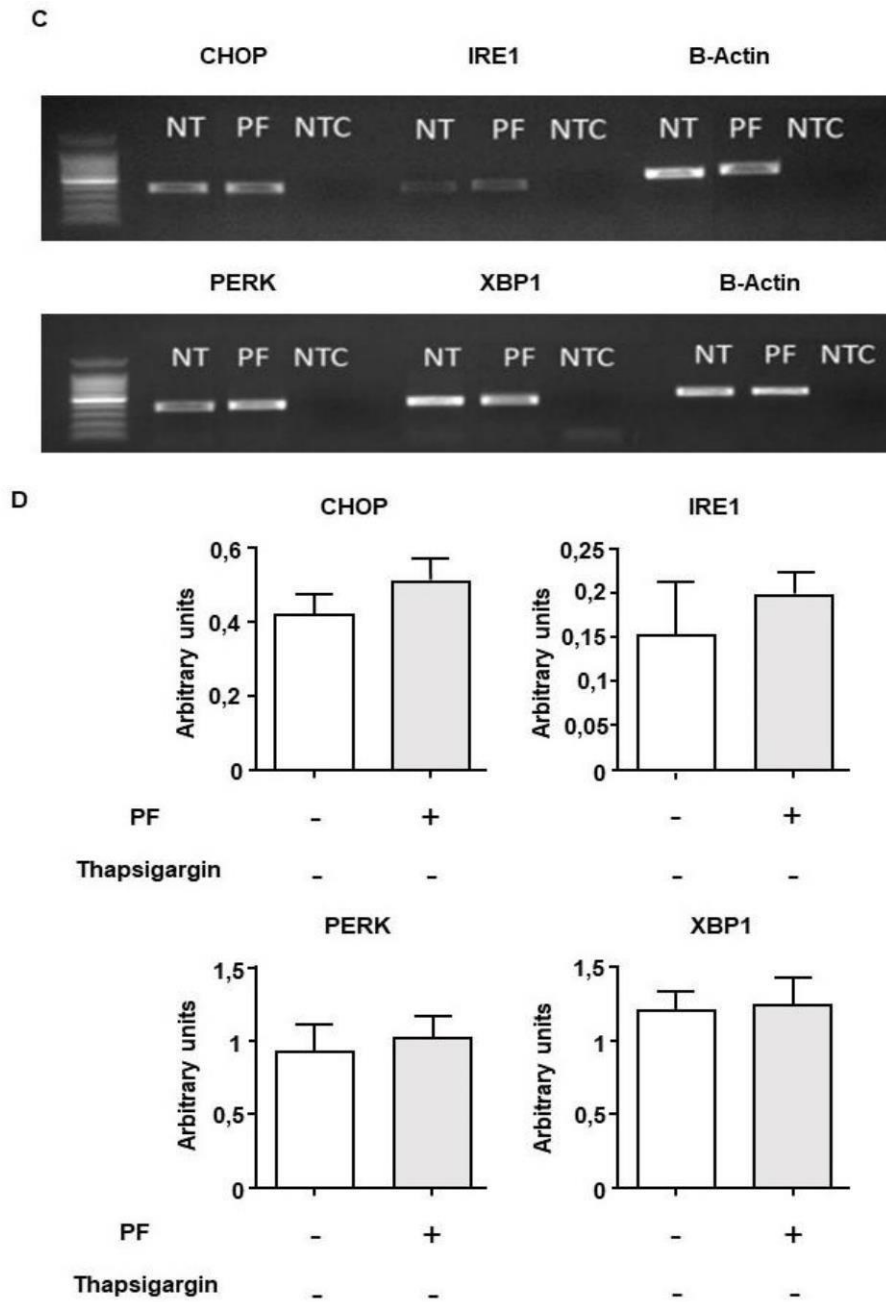


Figure 4. Expression of the UPR markers in response to MBTP1 inhibition in native CFBE41o- cells. A. The expression of Grp78 with or without PF and with or without thapsigargin was analyzed by

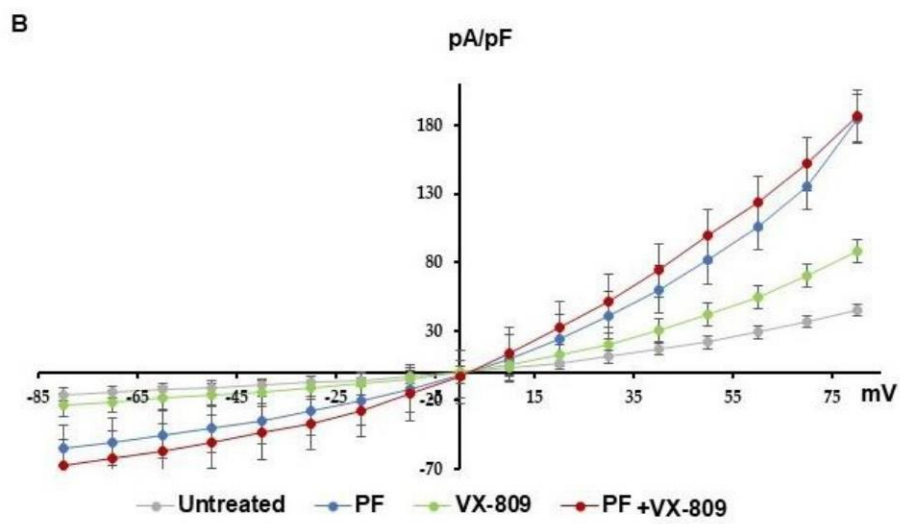
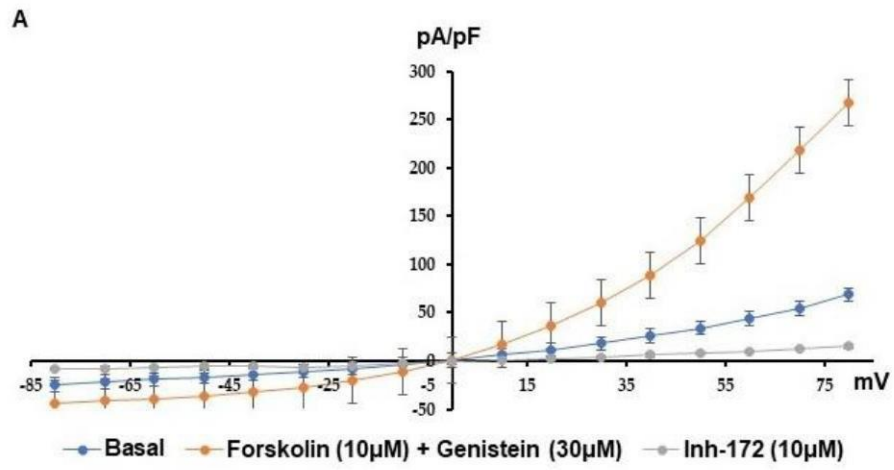
373
374
375

western blots (n=4). The image is a representative image of the detection of Grp78 (upper panel) and of β -actin (lower panel). A higher expression of Grp78 is observed in the presence of thapsigargin when compared to non-treated cells. A lower expression of Grp78 is observed when MBTP1 is inhibited, with or without thapsigargin. **B.** Bar graph representation of the statistical analysis of the expression of Grp78 which is significantly increased in the presence of thapsigargin and significantly decreased when MBTP1 is inhibited, with or without thapsigargin. **C.** Representative gels performed to detect and quantify the mRNA of CHOP, IRE1, PERK and XBP1 by PCR. NT: non-treated cells, PF: PF treated cells, NTC: no template control. **D.** The bar graphs are statistical representations of mRNA level of CHOP, IRE1, PERK and XBP1. No significant modification of their expression was observed.

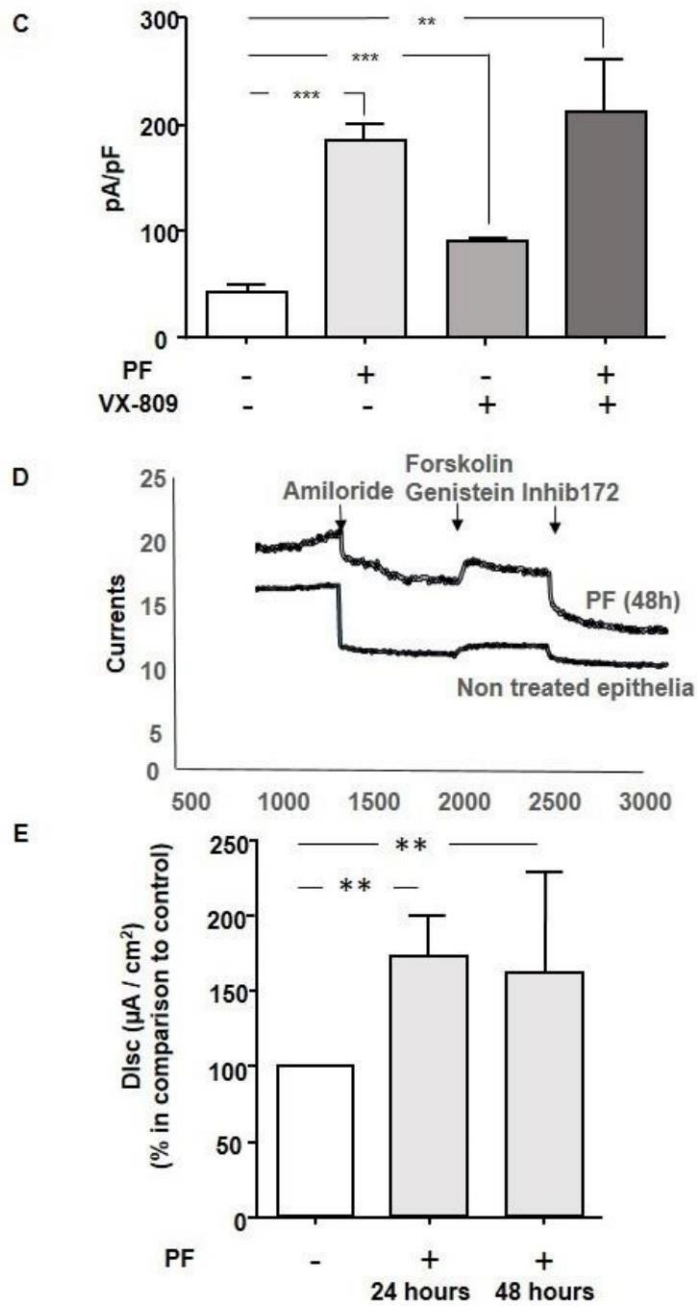
3.4. MBTP1 Inhibition Increases the Cl⁻ Efflux in Cells Expressing p.Phe508del-CFTR

In order to assess the effect of the inhibition of MBTP1 on the Cl⁻ channel function of p.Phe508del-CFTR, patch-clamp experiments were performed. Currents were measured in non-treated cells (Fig 5A) in the presence of the CFTR's activators (Forskolin and Genistein) and in the presence of the inhibitor-172, in order to verify that the recorded currents were due to p.Phe508del-CFTR. As expected, currents increased in the presence of the activators and decreased when the inhibitor was added. We next compared the effect of the inhibitor of MBTP1 with control condition, with currents due to the presence of VX-809 that was used as a reference and with a combination of PF plus VX-809. Representative I/V curves are shown in Fig. 5B. A statistical analysis was performed after a normalization of the currents (pA/pF) using the current values obtained at +80 mV. A bar graph representation of the results is shown in Fig. 5C. A significant increase of the Cl⁻ efflux via the p.Phe508del-CFTR channel was observed after the inhibition of MBTP1. The currents were greater in the presence of PF than in the presence of VX-809. However, no synergistic effect between both molecules was observed.

To verify the effect of the inhibition of MBTP1 in a more relevant model, shot-circuit current were measured in epithelia from patients using Ussing chamber. The statistical analysis showed that the inhibition of MBTP1 increased the currents through p.Phe508del-CFTR, after 24 hours and 48 hours of treatment (Fig. 5D).



405



406

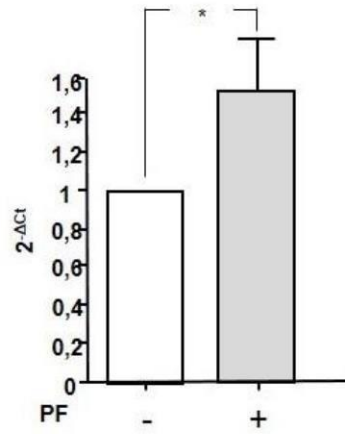
Figure 5. Cl⁻ efflux when MBTP1 is inhibited in native CFBE41o- cells. Cl⁻ efflux via the p.Phe508del-CFTR channel in the presence of PF with or without VX-809 were assessed by patch-clamp (whole cell configuration). A. Representative I/V curves obtained in a basal state with CFTR's activators and inhibitors which were used to assess the specificity of the recorded currents. B. Representative I/V curves obtained with PF and/or VX-809. Increased currents via p.Phe508del-CFTR were observed in all conditions when compared to the control condition. The conditions with PF show higher currents than other conditions. C. The bar graph represents the statistical analysis (Untreated: n=5; PF: n=10; VX-809: n=5; PF plus VX-809: n=4) of the normalized currents recorded at +80mV. MBTP1 inhibition significantly increases p.Phe508del-CFTR channel currents, above more than that of VX-809 but no significant synergistic effect is observed. D. Example of curves recorded during the Ussing chamber experiments. The upper curve was obtained with PF treated bronchial epithelial cells from a patient. The lower curve is the recording made with non-treated cells from the same patient. The responses to CFTR's activators and inhibitor were enhanced by PF. E. The bar graph represent the statistical analysis of p.Phe508del-CFTR currents recorded on bronchial epithelia from homozygous p.Phe508del patient in Ussing chamber assays. We show that MBTP1 inhibition (24 and 48 hours) significantly increases the p.Phe508del-CFTR currents in comparison to control condition (n=3).

3.5. Inhibition of MBTP1 Increases the Transcription and Protein Expression of p.Phe508del-CFTR

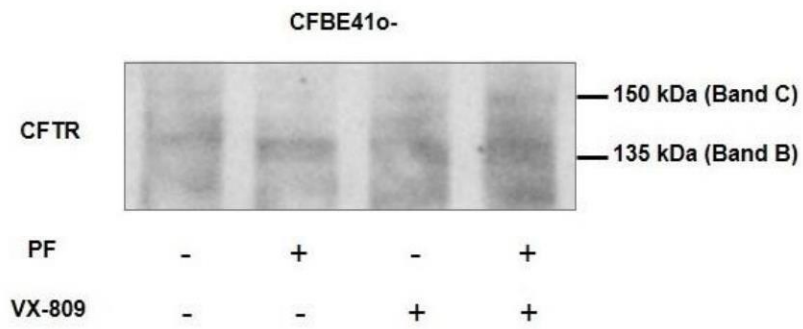
In order to compare the transcription of p.Phe508del-CFTR in cells, before and after the inhibition of MBTP1, real-time quantitative PCRs were performed. Because we failed to obtain reliable results with native cells, we used CFBE41o-/F508del cells. Fig. 6A is the bar graph representation of the statistical analysis of the 2- Δ Ct using β -Actin as a house-keeping gene and non-treated cells as a reference. The results show that the inhibition of MBTP1 significantly increased the gene expression of p.Phe508del-CFTR.

We further studied the protein expression of p.Phe508-del-CFTR in both CFBE41o- (Fig. 6B) and CFBE41o-/F508del cells (Fig. 6C) by immunoprecipitation. In both cell lines, we observed an increased band B expression after inhibition of MBTP1. Nevertheless, after VX-809 treatment, the amounts of band B and band C were higher than with the inhibitor. The combination of PF and VX-809 likely had an additive effect on the synthesis of the band B.

A



B



C

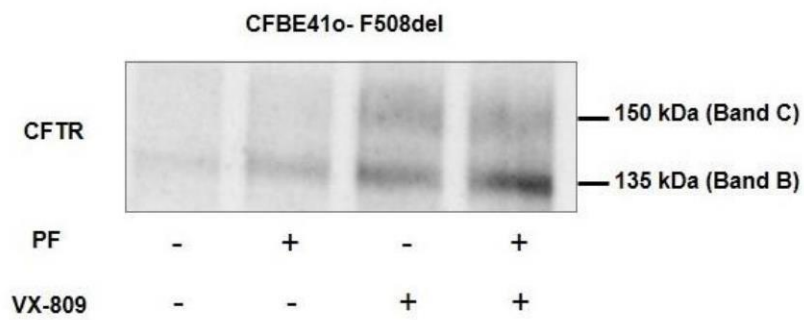


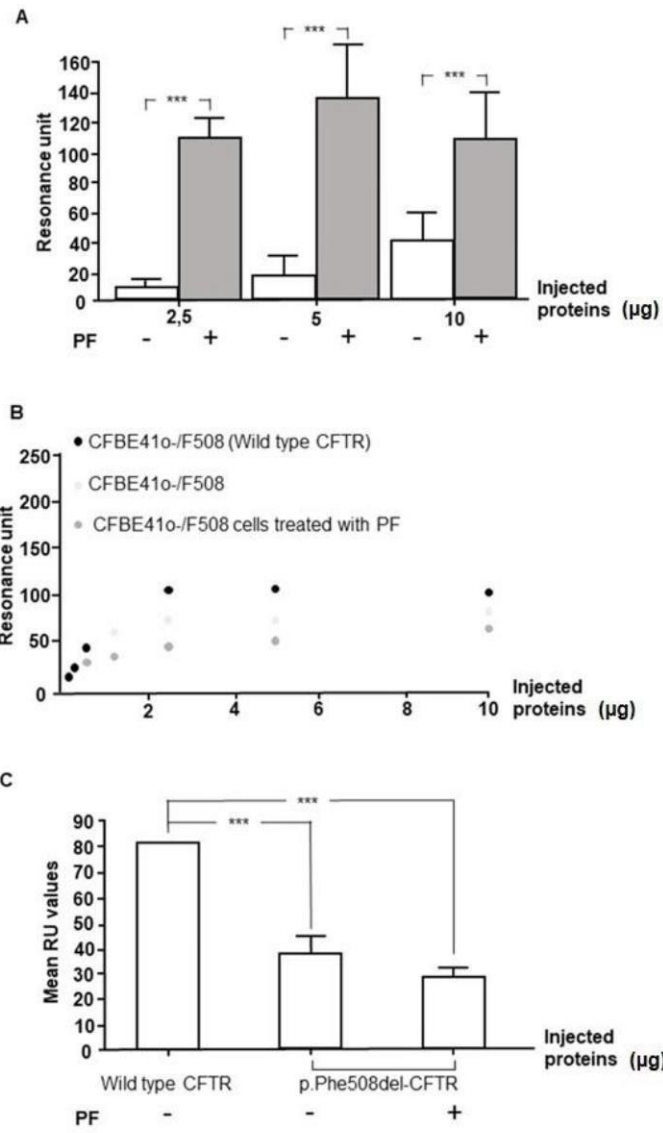
Figure 6. Expression of the CFTR mRNA and protein when MBTP1 is inhibited in native CFBE41o- cells and in transduced cells. A. The bar graph is the representation of the quantification of the real-time quantitative PCRs performed in CFBE41o-/F508del cells showing that the inhibition of MBTP1 significantly increases the gene expression of p.Phe508del-CFTR. Representative western blots after CFTR immunoprecipitation in CFBE41o- cells and in transduced CFBE41o-/F508del cells are shown in A and B, respectively. VX-809 was used to compare the qualitative effect of PF for the global p.Phe508del-CFTR synthesis. In CFBE41o- and CFBE41o-/F508del the inhibition of MBTP1 increases the expression of the band B of CFTR. VX-809 also increase CFTR band B expression and we found a synergistic effect on band B expression using a combination of PF and VX-809.

3.6. Inhibition of MBTP1 Increases the Expression of p.Phe508del-CFTR Protein

Because the expression of the p.Phe508del-CFTR protein is very low in non-transduced CFBE41o- cells, we used SPR to assess its amount before and after inhibition of MBTP1. Cell lysates (2.5, 5 and 10 µg) were injected over the immobilized antibody directed against CFTR. The association, equilibrium and dissociation phase were observed and the RU values used for the statistical analysis were recorded. The bar graph representation of the analysis is shown in Fig. 7A. For each quantity of the total protein that was injected, the amount p.Phe508del-CFTR protein which remained linked onto the anti-CFTR antibody was significantly higher in lysates of treated cells, indicating that inhibiting the activity of MBTP1 increases the total amount of the p.Phe508del-CFTR protein in the cells.

In order to know which form of CFTR was overexpressed (band B or C) we used a previously described method in which WGA is used to specifically link the C band of CFTR [47]. WGA was immobilized and the proteins were injected. An anti-CFTR was then injected to ensure that the linked proteins onto the WGA was CFTR. CFBE41o-/F508 cells were used to obtain enough p.Phe508del-CFTR protein in the lysate for these experiments. CFBE41o-/corr cells were used as a positive control for the expression of the mature form of CFTR and the linearity of the response was assessed (not shown). The results of the SPR analysis are presents in Fig. 7B. The upper curves represent the RU values of the sandwich formed by WGA/CFTR/anti-CFTR for various quantities of injected proteins. A plateau phase is observed above 2.5 µg of injected proteins. A statistical analysis of the responses was performed and is presented in Figure 7B, lower panel. The amount of the mature form of CFTR was significantly higher in cells expressing the normal CFTR than in cells expressing the p.Phe508del-CFTR protein, with or without MBTP1 inhibitor. The comparison between cells expressing the p.Phe508del-CFTR protein before and after PF treatment did not show any difference. The reverse experiment in which the anti-CFTR antibody was linked, the proteins were injected followed by the WGA was performed. As shown in Fig. 7C, upper panel, the presence of the mature form seemed increased in the lysates of the cells expressing the p.Phe508del-CFTR protein after MBTP1 inhibition. Nevertheless, the statistical analysis (Fig. 7C, lower graphs) did not confirm this observation.

The conclusion of the SPR experiments is that MBTP1 inhibition increases the total amount of p.Phe508del-CFTR protein and that the increased form of CFTR is the band B.



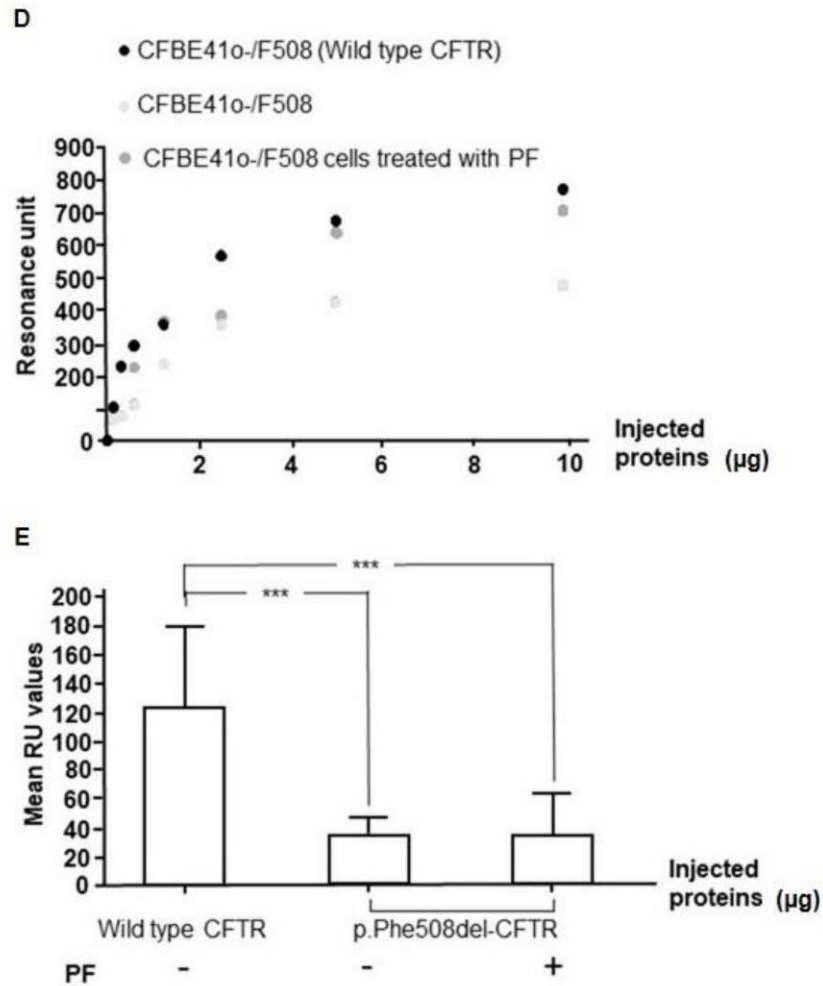


Figure 7. Study of the expression of the p.Phe508del-CFTR protein by SPR in native CFBE41o- cells. The expression of p.Phe508del-CFTR was assessed without and in the presence of PF. A. 2.5, 5 and 10 µg of total proteins from cell lysates were injected over an immobilized anti-CFTR antibody. The RU values were recorded 20 seconds after the beginning of the dissociation phase and used for the statistical analysis (n=3). The bar graph represents of the analysis and shows that the total amount of the p.Phe508del-CFTR protein is significantly increased when MBTP1 is inhibited. B. To assess which form of p.Phe508del-CFTR we used WGA to specifically link the band C and an anti-CFTR antibody to ensure that the linked proteins onto the WGA is really CFTR. The upper panel represents the curves of the RU values in function of the total amount of injected proteins (from 0 to 10 µg). The lower bar graph represents the analysis of the values obtained with 10 µg of proteins (n=5) and shows that there is less CFTR protein in cells expressing the mutated CFTR than in cells expressing the Wt-CFTR. In cells expressing p.Phe508del-CFTR, no more protein was linked onto WGA in the presence of PF. C. The opposite analysis in which the anti-CFTR was linked and WGA was injected was performed (n=5). The results are identical to that observed in B.

481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495

3.7. PF-429242 Increases the Expression of p.Phe508del-CFTR in Membranes

After showing that the inhibition of MBTP1 increases the global RNA and protein levels of p.Phe-508del-CFTR, we focused on its expression within membranes. Fig. 8 shows a representative image of a blot performed with crude membrane proteins enriched samples (lanes 1 to 4) and with a total lysate (lane 5). We observed that PF strongly increased the expression of the band B in the membranes whereas VX-809 increased the expression of the band C. The combination of PF and VX-809 induced increased expression of both band B and C in the membranes. The middle and the lower panels in fig. 8 show the detection of the Na⁺/K⁺-ATPase and aldolase in the samples, indicating that our samples were indeed enriched with membrane proteins.

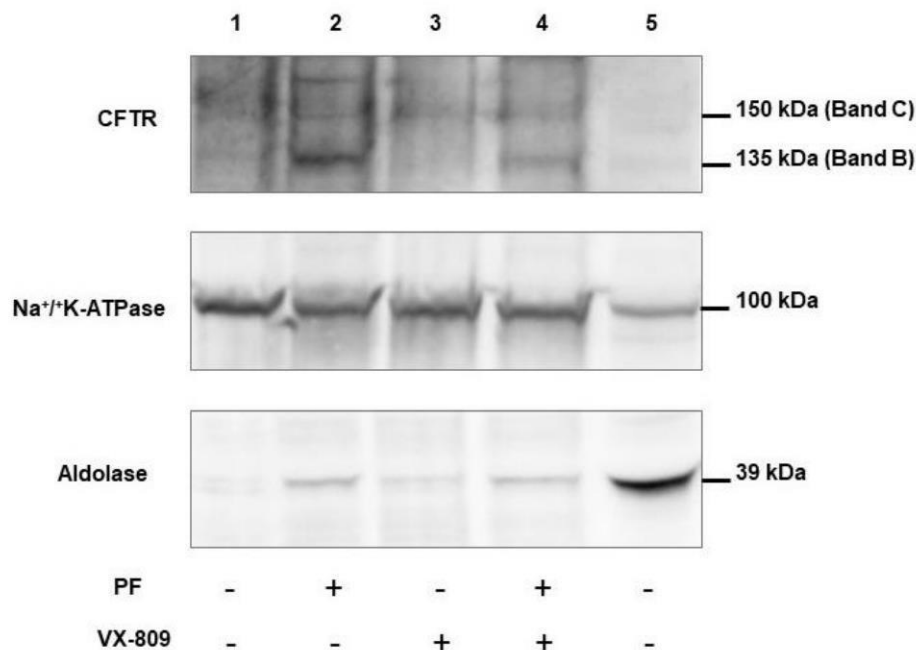


Figure 8. Membrane expression of p.Phe508del-CFTR when MBTP1 is inhibited in native CFBE41o-cells. The upper image is a representative western blot showing the expression of p.Phe508del-CFTR in membrane extract (lanes 1 to 4) and in total lysate (lane 5) when cells are treated with PF and/or VX-809. Na⁺/K⁺-ATPase was used as a marker of membranes (middle panel) and aldolase was used as a cytosolic marker (lower panel). The inhibition of MBTP1 increases the membrane expression of the band B of CFTR and the association with VX-809 increases the band C of CFTR at the membrane.

3.8. Comparison of the Gene Expression between Non Treated and PF-429242 Treated Cells

The Human Unfolded Protein Response RT² Profiler PCR Array used in the present study profiles the expression of 84 key genes involved in the UPR. It also determines whether the UPR pathway activity is increased or unchanged in experimental samples. We arbitrarily selected a selective modulation threshold of 4 in order to isolate genes that exhibit huge changes in their expression, in comparison to controls. A scatterplot showing the gene distribution of each genes modulation by comparing data from untreated and treated cells is shown in Fig. 9. Most of the genes were up-regulated by the treatment of the cells by PF. According to our selective criteria, 7 genes were found to be overexpressed

and 3 genes were down regulated when MBTP1 was inhibited. The significantly overexpressed genes were HSPA1B (Heat Shock Protein Family A (Hsp70 member 1B); fold change: +4.87; $p < 0.05$), CEBPB (CCAAT Enhancer Binding Protein Beta; fold change: +4.51; $p < 0.05$), VIMP (VCP-Interacting Membrane Protein; fold change: +4.18; $p < 0.001$). The PFND2, MAPK8, XBP1 and PPP1R15A genes had fold changes of 4.1, 4.18, 4.37, 4.51, 4.87, 5.08 and 7.76 respectively. Nevertheless, their increased expression was not found to be significant. The down-regulated genes (threshold 2) were INSIG1 (Insulin Induced Gene 1; fold change: -1.94; $p < 0.005$), CALR (Calreticulin; fold change: -4.9; not significant) and HSPA5 (BiP; fold change: -2.1; not significant).

522
523
524
525
526
527
528
529
530

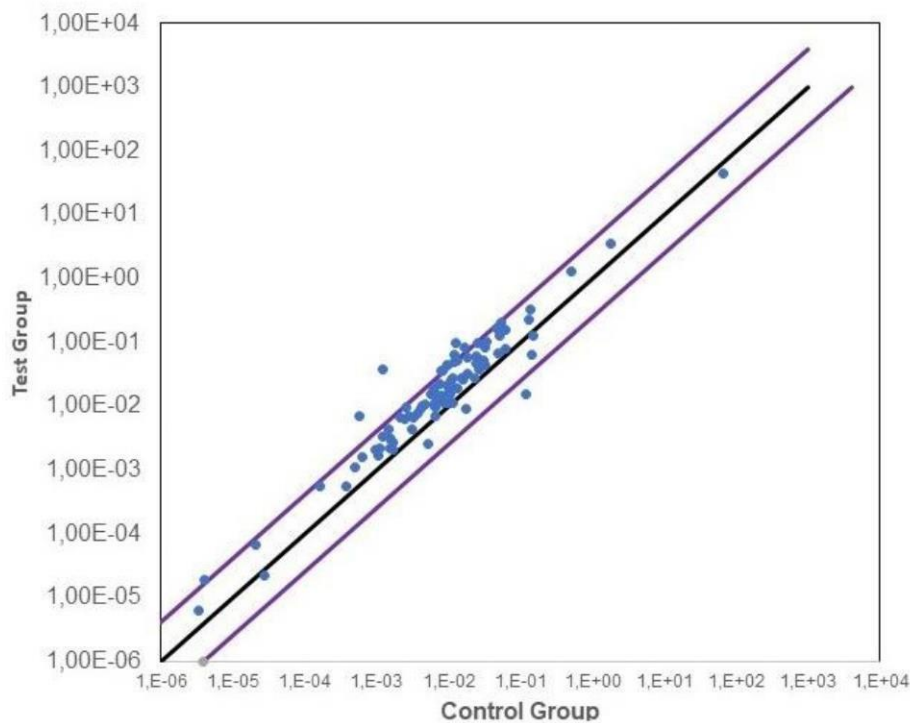


Figure 9. Gene modulation when MBTP1 is inhibited in native CFBE41o- cells. Untreated and treated cells were subjected to a qPCR-Array ($n=6$) aimed to assess 84 genes involved in the UPR. The image is a scatterplot showing the gene distribution of each genes modulation by comparing data from untreated and treated cells. The x axis is the $2^{-\Delta\Delta ct}$ of the control group and the y axis is the $2^{-\Delta\Delta ct}$ of the test group. Most of the genes were up-regulated when MBTP1 was inhibited. According to our selective criteria delimited by diagonal bars, 7 genes were found to be overexpressed and 3 genes were found to be down regulated.

531
532
533
534
535
536
537
538

4. Discussion

The triggering of the UPR in CF is still in debate. Some authors indicate that it is triggered by inflammation, some others indicate that it is likely triggered by the misfolded CFTR [[29], [31]] leading to an atypical form of UPR [32]. UPR is a complex process involving misfolded proteins, inflammation and also infection which are all present in CF [41]. Whatever triggers the UPR in CF, it inhibits endogenous CFTR expression due to the activation of ATF6 [[29], [30], [42]]. To be activated, ATF6 has to be cleaved by the serine

539
540
541
542
543
544
545

protease MBTP1 [24]. Therefore, we hypothesized and showed that the inhibition of this enzyme restores Cl⁻ efflux in cells overexpressing p.Phe508del-CFTR [33]. The aim of the present study was to show that in more relevant cells for CF (cells endogenously expressing p.Phe508del-CFTR and human bronchial cells from patients), the inhibition of MBTP1 alleviates the defects due to p.Phe508del-CFTR and to highlight the involved mechanisms.

We found that the inhibition of MBTP1 did not induce cell mortality or inflammation. The inhibition impedes the activation of ATF6 and of SREBP2 and subsequently, it increases the expression of p.Phe508del-CFTR within membranes, in accordance with our previous results obtained in different cell models than the ones used here [29,33]. Therefore, we showed for the first time that the inhibition MBTP1 alleviates the defects due to p.Phe508del-CFTR in relevant models for CF.

Inhibition of MBTP1 presents a promising avenue for therapeutic intervention across diverse medical conditions. In cancer, targeting MBTP1 impedes the processing SREBPs, thereby disrupting lipid metabolism crucial for cancer cell proliferation [43, 44]. In dyslipidemia, inhibiting MBTP1 may offer a means to modulate lipid homeostasis [45, 46]. Additionally, emerging research suggests that MBTP1 inhibition could be explored as a strategy against viral infections, as this protease plays a role in viral replication processes [47, 48]. The multifaceted potential of MBTP1protease inhibition underscores its significance as a therapeutic target. While MBTP1 inhibition is proposed as a potential therapy for various diseases, its pleiotropic nature raises concerns about its therapeutic use. Indeed, it is involved in diverse cellular processes, including lipid metabolism, immune response and cellular stress. The broad impact of its modulation may result in unintended consequences, affecting physiological functions beyond the targeted disease pathway. Striking a balance between therapeutic efficacy and minimizing off-target effects poses a challenge. Comprehensive understanding of the intricate roles MBTP1 plays in cellular pathways is crucial for optimizing its therapeutic potential while mitigating adverse effects. Indeed, the MBTP1 inhibition may have off-target effects that could be depicted by the inactivation of the MBTP1 gene. Nevertheless, in male CD1 mice treated with the inhibitor of MBTP1 at doses of 10 and 30 mg/kg/dose i.p. every 6 h for 24 h, beside the altered lipogenesis due to the inhibition of SREBP, no side effects were reported [36, 49]. Interestingly, rare cases of patients with reduced MBTP1 expression due to bi-allelic pathogenic variants resulting in MBTP1 deficiency, have been reported [50, 51]. These patients presented skeletal dysplasia and increased circulating lysosomal enzymes, by far the most obvious clinical manifestation, but no pulmonary alterations. These results suggest that, if MBTP1 inhibition were to be used in CF patients, precautions should be taken regarding dosage and duration of treatment.

In order to further estimate the effect of the inhibition of MBTP1 upon the triggering of the UPR, we assessed the expression of UPR's sensor Grp78 which is overexpressed when the ER is overloaded. Without, or in the presence of thapsigargin which is an UPR inducer, we observed a decreased expression of the UPR's sensor when PF was applied, indicating that UPR is decreased when MBTP1 is inhibited. Another possible explanation for the decreased expression of Grp78 is that the inhibition of ATF6 leads to a decreased presence of the p.Phe508del-CFTR protein in the ER that offers no binding sites for Grp78, inhibiting the UPR triggering. This could be due to an increased ERAD activity or to an increased output of the protein from the ER. Because the UPR induces the overexpression of the effectors of the ERAD by its three arms, we assessed the expression of IRE1 and XBP1, PERK and CHOP. Under PF treatment, no modification of the expression of these effectors was observed. Because when IRE1 is activated, it splices the mRNA encoding XBP1 which encodes a bZIP transcription factor that activates the expression of enzymes for the degradation of misfolded proteins [43,44], the absence of its activation likely indicates that the p.Phe508del-CFTR protein is less degraded and thus likely exported out of the ER. It has to be noticed that the activation is XBP1 has partially a redundant role with ATF6 [45]. Since the PERK pathway leads to the attenuation of the translational of proteins

and to the ER stress-induced apoptosis [22], the absence of its increased expression suggests that the stress-induced protein translation attenuation, as well as the apoptosis programs due to CHOP, is not prevalent when MBTP1 is inhibited. Nevertheless, XBP1s was detected, without any increased expression of IRE1. These results are in accordance with previous works showing that ATF6 leads to an up-regulation of XBP1 [43]. Nevertheless, the amount of XBP1 mRNA is a rate-limiting factor in the production of XBP1S [46]. Because the mRNA of XBP1 is not increased in the presence of PF, the spliced XBP1 produced at a low level, should be rapidly degraded by the proteasome, as previously described [44]. Taken together, these results indicate that the inhibition of MBTP1 does not trigger the UPR and that it is likely due to the exit of p.Phe508del-CFTR from the ER, to the plasma membrane.

Our assumption that the inhibition of MBTP1 allows misfolded proteins to exit the RE and reach the membrane was further tested. We observed increased Cl⁻ efflux via the mutated CFTR showing that there are more p.Phe508del-CFTR protein in the membrane of the cells. Furthermore, we showed that the p.Phe508del-CFTR's mRNA and protein are increased. Finally, we assessed the presence of the p.Phe508del-CFTR protein within membranes and found that when MBTP1 is inhibited, there is a higher synthesis of p.Phe508del-CFTR protein and that the alleviation of the Cl⁻ efflux is due to an increased amount of the immature form of CFTR (Band B) in membranes, which is also active as a Cl⁻ channel [11]. This results also indicate that the observed rescue does not occur through the Golgi apparatus but probably involves the unconventional protein secretion (UPS), in accordance with previous results showing that the rescued p.Phe508del-CFTR protein can use UPS [47]. This is a main result because, to our knowledge, no corrector of the p.Phe508del-CFTR protein is able to also induce an increased synthesis of its mRNA and protein. Beside UPS, ATF6 inhibition downregulates the expression of genes involved in the ER-associated degradation (ERAD) pathway. These genes are Derlin-1 that is involved in the retrotranslocation of misfolded proteins from the ER to the cytosol for subsequent degradation, Homocysteine-induced ER protein that is involved in the degradation of misfolded proteins, ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein which is involved in the recognizing and targeting misfolded glycoproteins for degradation, p97/VCP that plays a crucial role in extracting ubiquitinated substrates from the ER membrane for subsequent degradation by the proteasome and SEL1L that forms a complex with the ERAD E3 ubiquitin ligase and contributes to the recognition and degradation of misfolded proteins. Therefore, if ERAD activation is decreased or impaired, there might be a reduced efficiency in targeting F508del-CFTR for degradation. As a result, a larger fraction of the immature (band B) F508del-CFTR may escape degradation and progress through the secretory pathway. Beside degradation, it is important to note that the exact impact of ATF6 on endocytosis and recycling membrane proteins is not fully understood and that changes in its activation may modulate the internalization or recycling of specific membrane proteins which is increased in the case of F508del-CFTR.

To further understand how the inhibition of MBTP1 can rescue the p.Phe508del-CFTR protein and because the active form of ATF6 is a transcription factor targeting many genes, we used a qPCR-Array of 84 genes. The significantly overexpressed genes were HSPA1B, CEBPB, VIMP. HSPA1B (Heat Shock 70 KDa Protein 1B) is a molecular chaperone implicated in the protection of the proteome from stress, the folding and the transport of newly synthesized polypeptides and in the activation of proteolysis of misfolded proteins. It is involved in the degradation of the p.Phe508del-CFTR protein [48]. Nevertheless, HSPA1B maintains protein homeostasis during cellular stress by two opposing mechanisms which are protein refolding and degradation. It was demonstrated that it facilitates protein refolding after stress and slowly evolves to protein degradation depending on its acetylation state [49]. Therefore, in the present work, it is possible that it acts positively to protect p.Phe508del-CFTR. CEBPB is a transcription factor regulating the expression of genes involved in immune and inflammatory responses. It is essential in the lung for the

spatial and temporal regulation of the expression of the *CFTR* gene. Because it is demonstrated that CEBPB is a positive regulator acting on the *CFTR* promoter, it is a good candidate to explain our observed enhanced expression of the p.Phe508del-*CFTR* protein after the inhibition of MBTP1 [50,51]. VIMP is a small protein located at the ER membrane that interacts with both Derlin-1 and VCP, implying that it participates in ERAD. Unfortunately, it cannot explain the rescue of the p.Phe508del-*CFTR* protein because its overexpression reduces the steady-state level of p.Phe508del-*CFTR* protein by shortening its half-life [18]. Despite no significant overexpression, the *PFND2*, *MAPK8*, *XBP1* and *PPP1R15A* genes were increased when MBTP1 was inhibited. *PFND2* (Prefoldin Subunit 2) is a chaperone involved in proteins folding that was shown to favor the rescue of the p.Phe508del-*CFTR* protein in HEK293 and BHK cells [52]. *MAPK8/JNK1* is a serine/threonine-protein kinase involved in various processes such as cell proliferation, differentiation, migration, transformation, programmed cell death and autophagy. It was shown that the control of the stability of the *CFTR* mRNA is linked to the phosphorylation state *MAPK* [53]. Importantly, *MAPK8/JNK1* is a downstream effector of the kinase activity of the *IRE1 α* pathway [18]. Some studies describe that kinase pathway *TRAF2-ASK1-JNK1* following the *IRE1 α* activation, leads to the autophagy which seems to be involved in the transport of p.Phe508del-*CFTR* to the plasma membrane through the UPS pathway [54–56]. The role of *XBP1* was discussed above. *PPP1R15A* (*GADD34*) dephosphorylates the translation initiation factor *eIF-2A/EIF2S1* leading to reversing the shutoff of protein synthesis initiated by stress and facilitating recovery of cells [57,58]. Therefore, its activation is in favor an increased expression of *CFTR* in our model. Polyubiquitinated *GADD34* is rapidly eliminated upon removal of cell stress but when the proteasome is silenced, it is stabilized. It was shown that the stabilized form of *GADD34* enhanced the accumulation of the p.Phe508del-*CFTR* protein [59]. Therefore, its overexpression in our treated cells is in favor of an increased expression of the mutated *CFTR*.

At the opposite, *INSIG1*, *CALR* and *HSPA5* were found to be decreased but significance was reached only for *INSIG1*. *INSIG1* is a membrane protein of the ER that regulates cholesterol metabolism and lipogenesis homeostasis by blocking the processing of *SREBPs* [60]. Nevertheless, the *SREBPs* are activated by MBTP1 and we found that *SREBP2* was inhibited by PF [60,61]. Thus, the decreased *INSIG1* expression is further evidence that the inhibition of MBTP1 induces the inhibition of *ATF6* in our model. Lipids are unbalanced in CF with an increased accumulation of cholesterol in CF cells whereas *SREBPs* are the main regulators of the lipid homeostasis [62,63]. Therefore, their decreased accumulation due to the decreased *SREBP2* activity found when MBTP1 is inhibited, could favor a better membrane insertion and function of p.Phe508del-*CFTR* [63]. Because it was shown that ER stress responses can promote lipid accumulation in hepatocytes and despite to our knowledge this was never searched in epithelial cells, it can be proposed that the inhibition of MBTP1 without UPR triggering could be beneficial in CF cells [65]. Interestingly, *CALR* was decreased despite significance was not reached, when MBTP1 was inhibited. This could also explain our results by helping the membrane exportation of p.Phe508del-*CFTR* because *CALR* is a negative regulator of the cell surface expression of the mutated *CFTR* [64–66].

5. Conclusions

In conclusion, we show here for the first time that the inhibition of the MBTP1 enzyme alleviates the p.Phe508del-*CFTR* defects in cells endogenously expressing the mutated *CFTR* (cell line and patients bronchial cells), with a better effect than that of VX-809. Nevertheless, a triple combination (elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor, Trikafta™, Vertex) is approved for the treatment of CF patients with at least one p.Phe508del mutation or at least one other mutation in the *CF* gene that is responsive to Trikafta (*i.e.* 177 other approved mutations), regardless of their second mutation type [67–69, www.cff.org]. Whereas Trikafta™ is generally well tolerated with mild adverse events, 10–30% of the CF patients remain without any therapeutic alternative [66,69,70]. Indeed, patients with rare

variants remain excluded from the treatment and no clinical trials supported the use of Trikafta™ in the majority of rare genotypes lacking the p.Phe508del allele [71]. For these rare mutations and for the patients receiving Trikafta but presenting severe side effects, new molecules are needed. Inhibitors of MBTP1, alone or in combination with existing molecules, could be an alternative. Indeed, an increased synthesis and membrane localization of p.Phe508del-CFTR could be beneficial when a functional CFTR protein with decreased ion transfer is expressed, when a decreased production of the protein is observed and when there is a reduced CFTR membrane stability, which increases the turnover of the protein. Nevertheless, whereas, inhibition of MBTP1 seems to be well tolerated in mice, in CF patients, the potential side effects would need to be carefully considered. One approach could involve developing MBTP1 inhibitors that are specifically designed for short-term use during exacerbations. This would aim to harness the potential therapeutic benefits while minimizing the risk of long-term side effects. The therapy could be administered in conjunction with existing treatments during exacerbations to address the acute symptoms. Close monitoring of patients and thorough assessment of both short-term benefits and potential side effects would be essential in evaluating the effectiveness and safety of this approach. As with any potential therapy, further preclinical and clinical research would be necessary to determine the optimal dosage, duration, and safety profile of MBTP1 inhibition in the context of CF exacerbations. Collaborative efforts between researchers, clinicians, and pharmaceutical companies would be crucial to advance the development of such targeted therapies.

Author Contributions: Conceptualization, Pascal Trouvé; Methodology, Pascal Trouvé, Raphaël Santinelli, Nathalie Benz, Christelle Coraux; Validation, Pascal Trouvé, Raphaël Santinelli, Nathalie Benz, Christelle Coraux; Formal Analysis, Pascal Trouvé, Raphaël Santinelli, Nathalie Benz; Investigation, Raphaël Santinelli, Emilie Luczka-Majérus, Julie Guellec, Fabien Quinquis, Ervin Kocas, Johan Thomas, Sophian Tricotteaux-Zarqaoui, Chandran Ka, Nathalie Benz, Edouard Sage; Data Curation, Raphaël Santinelli, Emilie Luczka-Majérus, Christelle Coraux, Nathalie Benz; Writing – Original Draft Preparation, Raphaël Santinelli; Draft Reading, Claude Férec, Tristan Montier; Visualization, Claude Férec, Tristan Montier; Writing – Review & Editing, Pascal Trouvé; Supervision, Pascal Trouvé; Project Administration, Pascal Trouvé; Funding Acquisition, Pascal Trouvé, Claude Férec.

Funding: The authors would like to thank the Gaëtan Saleun association for its financial support and its contribution to RS's gratification. We also thank Brest-Métropole for its contribution to RS's gratification and SATT-Ouest Valorisation for its financial participation.

Institutional Review Board Statement: Human tissues from three F508del/F508del donors were collected with the authorisation of Biological Collection number DC-2012–1583 obtained from the French Ministry of Higher Education and Research, and with the approval number 21–775 of institutional review board 00003888.

Informed Consent Statement: Human tissues from three F508del/F508del donors were collected and used according to French law, with the informed consent of patients.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] B. S. Kerem *et al.*, « Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis », *Science*, vol. 245, n° 4922, p. 1073-1080, 1989, doi: 10.1126/science.2570460.
- [2] J. R. Riordan *et al.*, « Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA », *Science*, vol. 245, n° 4922, p. 1066-1073, sept. 1989, doi: 10.1126/science.2475911.
- [3] D. P. Rich *et al.*, « Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells », *Nature*, vol. 347, n° 6291, p. 358-363, sept. 1990, doi: 10.1038/347358a0.

- [4] A. D. Rhim, V. A. Kothari, P. J. Park, A. E. Mulberg, M. C. Glick, et T. F. Scanlin, « Terminal glycosylation of cystic fibrosis airway epithelial cells », *Glycoconj J*, vol. 17, n° 6, p. 385-391, juin 2000, doi: 10.1023/a:1007156014384. 755
- [5] S. H. Cheng *et al.*, « Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis », *Cell*, vol. 63, n° 4, p. 827-834, nov. 1990, doi: 10.1016/0092-8674(90)90148-8. 757
- [6] M. P. Anderson *et al.*, « Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity », *Science*, vol. 253, n° 5016, p. 202-205, juill. 1991, doi: 10.1126/science.1712984. 759
- [7] B. K. Berdiev, Y. J. Qadri, et D. J. Benos, « Assessment of the CFTR and ENaC association », *Mol Biosyst*, vol. 5, n° 2, p. 123-127, févr. 2009, doi: 10.1039/b810471a. 761
- [8] K. Du, M. Sharma, et G. L. Lukacs, « The DeltaF508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR », *Nat Struct Mol Biol*, vol. 12, n° 1, p. 17-25, janv. 2005, doi: 10.1038/nsmb882. 763
- [9] M. Sharma *et al.*, « Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes », *J Cell Biol*, vol. 164, n° 6, p. 923-933, mars 2004, doi: 10.1083/jcb.200312018. 766
- [10] C. L. Ward et R. R. Kopito, « Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins », *J. Biol. Chem.*, vol. 269, n° 41, p. 25710-25718, oct. 1994. 768
- [11] G. M. Denning, M. P. Anderson, J. F. Amara, J. Marshall, A. E. Smith, et M. J. Welsh, « Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive », *Nature*, vol. 358, n° 6389, p. 761-764, août 1992, doi: 10.1038/358761a0. 771
- [12] G. B. Pier *et al.*, « Role of Mutant CFTR in Hypersusceptibility of Cystic Fibrosis Patients to Lung Infections », *Science*, vol. 271, n° 5245, p. 64-67, janv. 1996. 774
- [13] M. Cohen-Cymbereknoh, E. Kerem, T. Ferkol, et A. Elizur, « Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications », *Thorax*, vol. 68, n° 12, p. 1157-1162, déc. 2013, doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-203204. 777
- [14] C. Y. Liu et R. J. Kaufman, « The unfolded protein response », *J Cell Sci*, vol. 116, n° Pt 10, p. 1861-1862, mai 2003, doi: 10.1242/jcs.00408. 779
- [15] M. Schröder et R. J. Kaufman, « The mammalian unfolded protein response », *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 74, p. 739-789, 2005, doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134. 781
- [16] I. G. Haas et M. Wabl, « Immunoglobulin heavy chain binding protein », *Nature*, vol. 306, n° 5941, p. 387-389, nov. 1983, doi: 10.1038/306387a0. 783
- [17] A. S. Lee, « The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress », *Methods*, vol. 35, n° 4, p. 373-381, avr. 2005, doi: 10.1016/j.ymeth.2004.10.010. 784
- [18] M. M. U. Ali *et al.*, « Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response », *EMBO J.*, vol. 30, n° 5, p. 894-905, mars 2011, doi: 10.1038/emboj.2011.18. 786
- [19] A. McQuiston et J. A. Diehl, « Recent insights into PERK-dependent signaling from the stressed endoplasmic reticulum », *F1000Res*, vol. 6, p. 1897, 2017, doi: 10.12688/f1000research.12138.1. 788
- [20] X. Chen, J. Shen, et R. Prywes, « The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi », *J Biol Chem*, vol. 277, n° 15, p. 13045-13052, avr. 2002, doi: 10.1074/jbc.M110636200. 790
- [21] T. W. Hai, F. Liu, W. J. Coukos, et M. R. Green, « Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers », *Genes Dev.*, vol. 3, n° 12B, p. 2083-2090, déc. 1989, doi: 10.1101/gad.3.12b.2083. 793

- [22] K. Zhang et R. J. Kaufman, « Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 25, p. 25935-25938, juin 2004, doi: 10.1074/jbc.R400008200. 796
797
- [23] K. Zhang et al., « Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response », *Cell*, vol. 124, n° 3, p. 587-599, févr. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2005.11.040. 798
799
- [24] J. Ye et al., « ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs », *Mol Cell*, vol. 6, n° 6, p. 1355-1364, déc. 2000, doi: 10.1016/s1097-2765(00)00133-7. 800
801
- [25] M. Li et al., « ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1 », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, n° 14, p. 5096-5106, juill. 2000, doi: 10.1128/mcb.20.14.5096-5106.2000. 802
803
804
- [26] J. Shen, X. Chen, L. Hendershot, et R. Prywes, « ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals », *Dev. Cell*, vol. 3, n° 1, p. 99-111, juill. 2002, doi: 10.1016/s1534-5807(02)00203-4. 805
806
807
- [27] J. S. Cox, C. E. Shamu, et P. Walter, « Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase », *Cell*, vol. 73, n° 6, p. 1197-1206, juin 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90648-a. 808
809
810
- [28] C. Zhu, F. E. Johansen, et R. Prywes, « Interaction of ATF6 and serum response factor », *Mol Cell Biol*, vol. 17, n° 9, p. 4957-4966, sept. 1997, doi: 10.1128/mcb.17.9.4957. 811
812
- [29] M. Kerbiriou, M.-A. Le Drévo, C. Férec, et P. Trouvé, « Coupling cystic fibrosis to endoplasmic reticulum stress: Differential role of Grp78 and ATF6 », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1772, n° 11-12, p. 1236-1249, déc. 2007, doi: 10.1016/j.bbadis.2007.10.004. 813
814
815
- [30] A. Rab, R. Bartoszewski, A. Jurkuvenaite, J. Wakefield, J. F. Collawn, et Z. Bebok, « Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response regulate genomic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression », *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, vol. 292, n° 2, p. C756-766, févr. 2007, doi: 10.1152/ajpcell.00391.2006. 816
817
818
- [31] R. Bartoszewski et al., « Activation of the unfolded protein response by deltaF508 CFTR », *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 39, n° 4, p. 448-457, oct. 2008, doi: 10.1165/rcmb.2008-0065OC. 819
820
- [32] C. J. Blohmke et al., « Atypical activation of the unfolded protein response in cystic fibrosis airway cells contributes to p38 MAPK-mediated innate immune responses », *J. Immunol.*, vol. 189, n° 11, p. 5467-5475, déc. 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1103661. 821
822
823
- [33] F. Huguet et al., « Evaluation of aminopyrrolidine amide to improve chloride transport in CFTR-defective cells », *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 72, p. 128866, sept. 2022, doi: 10.1016/j.bmcl.2022.128866. 824
825
- [34] B. Illek, R. Maurisse, L. Wahler, K. Kunzelmann, H. Fischer, et D. C. Gruenert, « Cl transport in complemented CF bronchial epithelial cells correlates with CFTR mRNA expression levels », *Cell Physiol Biochem*, vol. 22, n° 1-4, p. 57-68, 2008, doi: 10.1159/000149783. 826
827
828
- [35] E. Bruscia, F. Sanguolo, P. Sinibaldi, K. K. Goncz, G. Novelli, et D. C. Gruenert, « Isolation of CF cell lines corrected at DeltaF508-CFTR locus by SFHR-mediated targeting », *Gene Ther*, vol. 9, n° 11, p. 683-685, juin 2002, doi: 10.1038/sj.gt.3301741. 829
830
831
- [36] B. A. Hay et al., « Aminopyrrolidineamide inhibitors of site-1 protease », *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 17, n° 16, p. 4411-4414, août 2007, doi: 10.1016/j.bmcl.2007.06.031. 832
833
- [37] C. Farre, S. Stoelzle, C. Haarmann, M. George, A. Brüggemann, et N. Fertig, « Automated ion channel screening: patch clamping made easy », *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 11, n° 4, p. 557-565, avr. 2007, doi: 10.1517/14728222.11.4.557. 834
835
836

- [38] F. Huguet *et al.*, « Function and regulation of TRPM7, as well as intracellular magnesium content, are altered in cells expressing ΔF508-CFTR and G551D-CFTR », *Cell Mol Life Sci*, vol. 73, n° 17, p. 3351-3373, 2016, doi: 10.1007/s00018-016-2149-6. 837-839
- [39] P. Trouvé *et al.*, « Rapid detection of the mature form of cystic fibrosis transmembrane regulator by surface plasmon resonance », *Anal. Methods*, vol. 7, n° 1, p. 226-236, déc. 2014, doi: 10.1039/C4AY01679C. 840-841
- [40] R. Inoue *et al.*, « Uncoupling protein 2 and aldolase B impact insulin release by modulating mitochondrial function and Ca²⁺ release from the ER », *iScience*, vol. 25, n° 7, p. 104603, juill. 2022, doi: 10.1016/j.isci.2022.104603. 842-843
- [41] P. Trouvé, C. Férec, et E. Génin, « The Interplay between the Unfolded Protein Response, Inflammation and Infection in Cystic Fibrosis », *Cells*, vol. 10, n° 11, p. 2980, nov. 2021, doi: 10.3390/cells10112980. 844-845
- [42] R. Bartoszewski *et al.*, « The mechanism of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transcriptional repression during the unfolded protein response », *J Biol Chem*, vol. 283, n° 18, p. 12154-12165, mai 2008, doi: 10.1074/jbc.M707610200. 846-848
- [43] B. T. Caruana, A. Skoric, A. J. Brown, et L. H. Lütze-Mann, « Site-1 protease, a novel metabolic target for glioblastoma », *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 490, n° 3, p. 760-766, août 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.114. 849-850
- [44] J.-C. Lin, T.-P. Liu, Y.-B. Chen, et P.-M. Yang, « PF-429242 exhibits anticancer activity in hepatocellular carcinoma cells via FOXO1-dependent autophagic cell death and IGFBP1-dependent anti-survival signaling », *Am J Cancer Res*, vol. 13, n° 9, p. 4125-4144, 2023. 851-853
- [45] J. L. Hawkins *et al.*, « Pharmacologic inhibition of site 1 protease activity inhibits sterol regulatory element-binding protein processing and reduces lipogenic enzyme gene expression and lipid synthesis in cultured cells and experimental animals », *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 326, n° 3, p. 801-808, sept. 2008, doi: 10.1124/jpet.108.139626. 854-856
- [46] N. G. Seidah et A. Prat, « The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia », *J Mol Med (Berl)*, vol. 85, n° 7, p. 685-696, juill. 2007, doi: 10.1007/s00109-007-0172-7. 857-858
- [47] M. Blanchet, C. Sureau, C. Guévin, N. G. Seidah, et P. Labonté, « SKI-1/S1P inhibitor PF-429242 impairs the onset of HCV infection », *Antiviral Res*, vol. 115, p. 94-104, mars 2015, doi: 10.1016/j.antiviral.2014.12.017. 859-860
- [48] L. Uchida *et al.*, « Suppressive Effects of the Site 1 Protease (S1P) Inhibitor, PF-429242, on Dengue Virus Propagation », *Viruses*, vol. 8, n° 2, p. 46, févr. 2016, doi: 10.3390/v8020046. 861-862
- [49] Y. Feng, K. Peng, R. Luo, F. Wang, et T. Yang, « Site-1 Protease-Derived Soluble (Pro)Renin Receptor Contributes to Angiotensin II-Induced Hypertension in Mice », *Hypertension*, vol. 77, n° 2, p. 405-416, févr. 2021, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15100. 863-865
- [50] Y. Yuan, Q. Zhou, C. Wang, W. Zhou, W. Gu, et B. Zheng, « Clinical and molecular characterization of a patient with MBTPS1 related spondyloepiphyseal dysplasia: Evidence of pathogenicity for a synonymous variant », *Front Pediatr*, vol. 10, p. 1056141, 2022, doi: 10.3389/fped.2022.1056141. 866-868
- [51] Y. Kondo *et al.*, « Site-1 protease deficiency causes human skeletal dysplasia due to defective inter-organelle protein trafficking », *JCI Insight*, vol. 3, n° 14, p. e121596, 121596, juill. 2018, doi: 10.1172/jci.insight.121596. 869-870
- [52] H. Yoshida, T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, et K. Mori, « XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor », *Cell*, vol. 107, n° 7, p. 881-891, déc. 2001, doi: 10.1016/s0092-8674(01)00611-0. 871-873
- [53] L. H. Glimcher, « XBP1: the last two decades », *Ann Rheum Dis*, vol. 69 Suppl 1, p. i67-71, janv. 2010, doi: 10.1136/ard.2009.119388. 874-875
- [54] K. Yamamoto, H. Yoshida, K. Kokame, R. J. Kaufman, et K. Mori, « Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II », *J Biochem*, vol. 136, n° 3, p. 343-350, sept. 2004, doi: 10.1093/jb/mvh122. 876-878

- [55] M. Majumder *et al.*, « A Novel Feedback Loop Regulates the Response to Endoplasmic Reticulum Stress via the Cooperation of Cytoplasmic Splicing and mRNA Translation », *Mol Cell Biol*, vol. 32, n° 5, p. 992-1003, mars 2012, doi: 10.1128/MCB.06665-11. 879-881
- [56] H. Y. Gee, S. H. Noh, B. L. Tang, K. H. Kim, et M. G. Lee, « Rescue of $\Delta F508$ -CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway », *Cell*, vol. 146, n° 5, p. 746-760, sept. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.07.021. 882-883
- [57] P. Kim Chiaw *et al.*, « Hsp70 and DNAJA2 limit CFTR levels through degradation », *PLoS One*, vol. 14, n° 8, p. e0220984, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0220984. 884-885
- [58] J. H. Seo *et al.*, « ARD1-mediated Hsp70 acetylation balances stress-induced protein refolding and degradation », *Nat Commun*, vol. 7, p. 12882, oct. 2016, doi: 10.1038/ncomms12882. 886-887
- [59] N. Pittman, G. Shue, N. S. LeLeiko, et M. J. Walsh, « Transcription of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator requires a CCAAT-like element for both basal and cAMP-mediated regulation », *J Biol Chem*, vol. 270, n° 48, p. 28848-28857, déc. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.48.28848. 888-890
- [60] M. NandyMazumdar *et al.*, « Looping of upstream cis-regulatory elements is required for CFTR expression in human airway epithelial cells », *Nucleic Acids Res*, vol. 48, n° 7, p. 3513-3524, avr. 2020, doi: 10.1093/nar/gkaa089. 891-892
- [61] J. F. Collawn, L. Fu, et Z. Bebok, « Targets for cystic fibrosis therapy: proteomic analysis and correction of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator », *Expert Rev Proteomics*, vol. 7, n° 4, p. 495-506, août 2010, doi: 10.1586/epr.10.45. 893-895
- [62] M. Baudouin-Legros *et al.*, « Cell-specific posttranscriptional regulation of CFTR gene expression via influence of MAPK cascades on 3'UTR part of transcripts », *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 289, n° 5, p. C1240-1250, nov. 2005, doi: 10.1152/ajpcell.00595.2004. 896-897
- [63] H.-D. Xu et Z.-H. Qin, « Beclin 1, Bcl-2 and Autophagy », in *Autophagy: Biology and Diseases: Basic Science*, Z.-H. Qin, Éd., in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Singapore: Springer, 2019, p. 109-126. doi: 10.1007/978-981-15-0602-4_5. 899-900
- [64] M. Bhardwaj, N. M. Leli, C. Koumenis, et R. K. Amaravadi, « Regulation of autophagy by canonical and non-canonical ER stress responses », *Semin Cancer Biol*, vol. 66, p. 116-128, nov. 2020, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.11.007. 902-903
- [65] H. Park, D. H. Shin, J.-R. Sim, S. Aum, et M. G. Lee, « IRE1 α kinase-mediated unconventional protein secretion rescues misfolded CFTR and pendrin », *Sci Adv*, vol. 6, n° 8, p. eaax9914, févr. 2020, doi: 10.1126/sciadv.aax9914. 904-905
- [66] S. Oyadomari et M. Mori, « Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress », *Cell Death Differ*, vol. 11, n° 4, p. 381-389, avr. 2004, doi: 10.1038/sj.cdd.4401373. 906-907
- [67] Y.-Y. Lee, R. C. Cevallos, et E. Jan, « An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2 α phosphorylation », *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n° 11, p. 6661-6673, mars 2009, doi: 10.1074/jbc.M806735200. 908-909
- [68] M. H. Brush et S. Shenolikar, « Control of cellular GADD34 levels by the 26S proteasome », *Mol Cell Biol*, vol. 28, n° 23, p. 6989-7000, déc. 2008, doi: 10.1128/MCB.00724-08. 911-912
- [69] J. P. Bridges *et al.*, « Epithelial SCAP/INSIG/SREBP signaling regulates multiple biological processes during perinatal lung maturation », *PLoS One*, vol. 9, n° 5, p. e91376, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0091376. 913-914
- [70] R. McPherson et A. Gauthier, « Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis », *Biochem Cell Biol*, vol. 82, n° 1, p. 201-211, févr. 2004, doi: 10.1139/o03-090. 915-916
- [71] W. L. Ernst, K. Shome, C. C. Wu, X. Gong, R. A. Frizzell, et M. Aridor, « VAMP-associated Proteins (VAP) as Receptors That Couple Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Proteostasis with Lipid Homeostasis », *J Biol Chem*, vol. 291, n° 10, p. 5206-5220, mars 2016, doi: 10.1074/jbc.M115.692749. 917-919

- [72] D. Eberlé, B. Hegarty, P. Bossard, P. Ferré, et F. Fougelle, « SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis », *Biochimie*, vol. 86, n° 11, p. 839-848, nov. 2004, doi: 10.1016/j.biochi.2004.09.018. 920
- [73] K. A. Cottrill, C. M. Farinha, et N. A. McCarty, « The bidirectional relationship between CFTR and lipids », *Commun Biol*, vol. 3, p. 179, avr. 2020, doi: 10.1038/s42003-020-0909-1. 921
- [74] A. Baiceanu, P. Mesdom, M. Lagouge, et F. Fougelle, « Endoplasmic reticulum proteostasis in hepatic steatosis », *Nat Rev Endocrinol*, vol. 12, n° 12, p. 710-722, déc. 2016, doi: 10.1038/nrendo.2016.124. 922
- [75] H. G. M. Heijerman *et al.*, « 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*, vol. 394, n° 10212, p. 1940-1948, nov. 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)32597-8. 923
- [76] D. Keating *et al.*, « VX-445–Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles », *N Engl J Med*, vol. 379, n° 17, p. 1612-1620, oct. 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1807120. 924
- [77] P. G. Middleton *et al.*, « Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele », *N Engl J Med*, vol. 381, n° 19, p. 1809-1819, nov. 2019, doi: 10.1056/NEJMoa1908639. 925
- [78] B. L. Aalbers *et al.*, « Clinical effect of lumacaftor/ivacaftor in F508del homozygous CF patients with FEV1 ≥ 90% predicted at baseline », *Journal of Cystic Fibrosis*, vol. 19, n° 4, p. 654-658, juill. 2020, doi: 10.1016/j.jcf.2019.12.015. 926
- [79] S. Lo Cicero *et al.*, « L1077P CFTR pathogenic variant function rescue by Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor in cystic fibrosis patient-derived air–liquid interface (ALI) cultures and organoids: in vitro guided personalized therapy of non-F508del patients », *Respir Res*, vol. 24, p. 217, 2023, doi: 10.1186/s12931-023-02516-0. 927
- [80] M. Harutyunyan, Y. Huang, K.-S. Mun, F. Yang, K. Arora, et A. P. Naren, « Personalized medicine in CF: from modulator development to therapy for cystic fibrosis patients with rare CFTR mutations », *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 314, n° 4, p. L529-L543, avr. 2018, doi: 10.1152/ajplung.00465.2017. 928

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content. 929

II. Etude du mécanisme moléculaire menant au transport membranaire du p.Phe508del-CFTR suite à l'inhibition de la S1P.

Introduction

Depuis une quinzaine d'années maintenant, l'UPS, une voie alternative à la voie de sécrétion conventionnelle des protéines, a commencé à être décrite. La découverte de cette voie a permis d'apporter quelques explications concernant le phénomène à l'origine du transport du p.Phe508del-CFTR jusqu'à la membrane plasmique. Une des quatre voies composant ce mécanisme permet le transport de protéines transmembranaires mutées du RE jusqu'à la membrane plasmique, et cela sans passer par l'appareil de Golgi. L'UPS se déclenche sous l'effet d'un stress cellulaire, et est régulée en particulier par l'activité de la voie IRE1 α . GRASP55 et Sec16a sont les premiers acteurs à avoir été mis en évidence dans ce mécanisme dans le cadre du transport du p.Phe508del-CFTR. Puis l'implication d'effecteurs précoces de l'autophagie, régulés par la voie IRE1 α mais également par la voie PERK, a été décrite. Parmi eux, LC3 et la Beclin-1 font partie des acteurs principalement étudiés. JNK1, une kinase dont l'activité est régulée par l'activité kinase de IRE1 α , permet la formation du complexe PI3KC3. Ce dernier permettant de produire les principaux lipides composants la membrane des autophagosomes.

Nous avons montré précédemment des effets bénéfiques de l'inhibition de la S1P sur les efflux d'ions Cl⁻ lié à l'activité du p.Phe508del-CFTR. Nous avons vu que cet effet était dû à une augmentation de l'expression globale de cette protéine, ainsi qu'à une augmentation de son exportation membranaire. Nous avons donc voulu savoir si cet effet était lié à l'activation de l'UPS. En effet, les voies de l'UPR étant interconnectées, nous sommes donc partis de l'hypothèse qu'inhiber ATF6 pouvait déclencher une activation de la voie IRE1 α par un effet compensatoire. De plus, certaines études avaient déjà montré que l'activité d'ATF6 permettait l'activation du complexe mTORC1, principal inhibiteur du déclenchement de l'autophagie, nous confortant dans l'idée d'explorer cette voie.

Cette étude est destinée à être publiée. Au moment où ces lignes sont écrites, certains résultats sont encore préliminaires. L'article présenté ici n'est donc pas sous sa forme finale. Une présentation en français des résultats préliminaires est faite après les références de l'article.

Résultats

Dans un premier temps nous nous sommes focalisés sur l'expression et la phosphorylation de IRE1 α .

Nous avons étudié son expression globale en présence de PF, de thapsigargine ou en associant les deux. Nous avons observé que les deux traitements seuls augmentent de manière

significative l'expression de IRE1 α par rapport à la condition contrôle. De plus, même si la différence n'est pas significative, le PF semble augmenter plus fortement l'expression de IRE1 α que dans le cas d'un traitement à la thapsigargine seule. L'association des deux molécules augmente également significativement l'expression de IRE1 α . De plus, elle est significativement plus forte que celle observée dans les conditions de traitements seuls, faisant penser à la présence d'un effet additif.

La phosphorylation de IRE1 α a été évaluée dans les mêmes conditions. Le traitement au PF augmente significativement la phosphorylation de cette protéine, tandis que la thapsigargine ne le fait pas. Une tendance à l'augmentation assez marquée est néanmoins observée dans ce dernier cas. La condition associant le PF et la thapsigargine montre la présence d'une phosphorylation plus forte que dans la condition contrôle. Elle tend à être plus importante que celle observée dans la condition de traitement au PF seul.

Sachant que nous avons observé une phosphorylation de IRE1 α après avoir inhibé la S1P, nous avons voulu connaître l'état d'activation de XBP1.

Nous avons observé dans un premier temps par PCR que le PF augmentait le clivage de XBP1 (XBP1s une fois clivé). Nous avons ensuite vérifié cela par western blots. Sous traitement à la thapsigargine, la bande correspondant à la forme clivée de XBP1s est fortement détectée. La condition de traitement au PF montre la présence d'une bande moins dense que par rapport au traitement à la thapsigargine, mais plus forte que dans la condition contrôle. Le traitement du PF puis de la thapsigargine ne montre pas d'augmentation synergique ou additive. L'intensité de la bande est proche de celle détectée dans la condition de traitement au PF seul.

Pour investiguer plus en profondeur le mécanisme moléculaire sous-jacent, nous avons mesuré l'expression de vingt protéines connues pour être impliquées dans l'autophagie. Deux d'entre elles ont eu leur expression significativement augmentée après un traitement au PF : LC3A et LAMP-1.

Leur expression a été ensuite vérifiée par western blot. Concernant LC3A, son expression est significativement augmentée après l'ajout de PF. L'utilisation de la thapsigargine tend à montrer une augmentation d'expression de LC3A en comparaison à la condition contrôle. La condition PF plus thapsigargine montre une augmentation significative de l'expression en comparaison aux conditions contrôle et de traitement à la thapsigargine. Au sujet de LAMP-1, son expression est significativement augmentée après les conditions de traitements au PF, avec ou sans thapsigargine. La thapsigargine seule ne semble pas jouer sur l'expression de cette protéine.

Discussion

Nous avons montré qu'inhiber S1P, et donc ATF6, permettait d'augmenter l'expression de IRE1 α en plus d'augmenter sa phosphorylation. Étonnamment, la thapsigargine n'a pas donné de résultats significatifs sur ces paramètres. Cependant, une tendance à la hausse

concernant l'expression et l'état de phosphorylation de IRE1 α est observée. De plus, l'association de la thapsigargine et du PF semble conduire à un effet additif sur l'expression et l'activation de IRE1 α .

Une des conséquences de l'activation de cette voie est le clivage de XBP1 qui permet la transcription des gènes cibles de la voie IRE1 α . Nous avons montré ici que XBP1s était plus détecté après avoir inhibé la S1P. En revanche, l'association du PF et de la thapsigargine n'a pas montré d'effet additif ou synergique. Au contraire, la bande correspondant à XBP1s a une intensité très proche de celle observée dans la condition de traitement au PF seul. Il est possible que le PF permette de réguler le clivage de XBP1, et donc de maintenir un état d'équilibre pour que ses gènes cibles s'activent et participe à restaurer l'homéostasie cellulaire sans l'apoptose.

Nous avons souligné la surexpression de deux protéines connues pour être impliquées dans l'autophagie : LC3A et la LAMP-1.

LC3A est une protéine faisant partie de la famille des ATG8. Il y a trois homologues de LC3 : LC3A (possédant deux variants), LC3B et LC3C. Ces protéines ont des séquences polypeptidiques très proches mais ne sont pas codées par les mêmes régions du génome. Une différence de fonction entre ces différents homologues n'a pas été relevée à ce jour. Cependant, il a été montré que leurs localisations cellulaires différaient. Ainsi, LC3B alterne entre le noyau et le cytoplasme, LC3C compense l'absence de LC3B aux endroits de la cellule où cette dernière est manquante. Concernant LC3A, elle a été retrouvée aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme, avec peu de variations de localisation observées en fonction de l'état cellulaire.

LAMP-1 est surtout connu pour constituer 50% de la membrane des lysosomes avec son homologue LAMP-2, ce qui en fait un marqueur permettant d'évaluer la formation de ces vésicules. Cependant, LAMP-1 fait également partie des pistes explorées pour expliquer le transport des protéines cargo entre la sortie de l'appareil de Golgi et la membrane plasmique. Etant donné qu'il est connu que de nombreuses membranes cellulaires peuvent être à l'origine de la formation des PAS, il se pourrait que LAMP-1 joue un rôle dans la formation des vésicules apportant des lipides jusqu'à ces structures.

Nous n'avons pas vérifié si l'activité kinase d'IRE1 α , au-travers de la cascade de signalisation TRAF2-ASK1-JNK1, était mise en place. Cet aspect de la voie IRE1 α a déjà montré son implication dans l'UPS. De plus, obtenir des informations sur l'implication de la voie PERK pourrait également nous permettre d'obtenir des réponses quant au déroulé de tout ce mécanisme moléculaire permettant le transport du p.Phe508del-CFTR jusqu'à la membrane plasmique.

A partir de nos résultats et des données issues de la littérature, nous avons proposé un schéma récapitulatif (Figure 5). Ce schéma présente un modèle expliquant l'effet de l'inhibition

de la SIP sur le transport membranaire du p.Phe508del-CFTR via l'UPS, et l'implication des différents acteurs que nous avons étudié.

MBTP1 inhibition lead to the membranous transport of p.Phe508del-CFTR through the unconventional secretion pathway.

Raphaël Santinelli¹, Nathalie Benz¹, Pascal Trouvé¹

¹Univ Brest, INSERM, EFS, UMR 1078, GGB – GTCA team, F-29200 Brest, France.

Abstract

In Cystic fibrosis (CF) the most common mutation p.Phe508del leads to the synthesis of a misfolded protein (p.Phe508del-CFTR) retained in the endoplasmic reticulum (ER). Most of it is degraded by the proteasome but a small amount is transported to the plasma membrane. For few years, the unconventional protein secretion (UPS) pathway is described as the mechanism leading to this effect. UPS involves components of autophagy and is regulated by the unfolded protein response (UPR). Hence, we propose a model explaining the transport of p.Phe508del-CFTR to the plasma membrane through the inhibition of MBTP1, a key regulator of the ATF6 pathway which is one of the arms of the UPR. We show the involvement of the UPS through the regulation of some of its major components regulated by inhibition of MBTP1.

Keywords

Cystic fibrosis ; Unfolded protein response ; Unconventional protein secretion ; Autophagy ; p.Phe508del-CFTR transport ; CFBE41o-

Abbreviations

AMPK : Adenosine monophosphate protein kinase ; ASK1: apoptosis signal-regulating kinase 1 ; ATF6: Activating transcription factor 6 ; CF: Cystic fibrosis ; CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ; ER: Endoplasmic reticulum ; ERES: Endoplasmic reticulum exit sites ; IRE1 α : Inositol-Requiring Enzyme 1 α ; JNK1: c-Jun N-terminal kinase 1 ; LC3: microtubule-binding protein-1 Light-Chain-3 ; mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1 ; PERK: Protein kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase ; PE: phosphatidylethanolamine ; PF: PF-429242 ; PI3KC3: class III phosphatidylinositol 3-kinase ; PI3P: phosphatidylinositol-3-phosphate ; MBTP1: membrane-bound transcription factor site-1 protease ; Tg: Thapsigargin ; UPR: Unfolded protein response ; UPS: Unconventional protein secretion

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is the most common genetic lethal disease found in the European population. More than 2100 mutations leading to the disease are currently described in the *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) gene which encodes a homonymous channel-protein involved in chloride and bicarbonate anion efflux (1–5). The most common mutation is a deletion of a phenylalanine at position 508 of the polypeptide sequence (p.Phe508del), producing the protein named p.Phe508del-CFTR (6,7). This protein is altered, can't validate the endoplasmic reticulum (ER) quality control steps and is retained in the ER's lumen. A large amount of the protein is degraded by the endoplasmic reticulum-associated protein degradation (6,8,9). This impedes the transport of p.Phe508del-CFTR to the plasma membrane of cells and it is estimated that only 1% (8,10) of it can reach this location as a core-glycosylated form named band B (11–14).

In CF, in addition to the inflammatory and infectious response (15–18), the ER overload due to p.Phe508del-CFTR accumulation in its lumen induces a long term stress in cells (19–21). This stress is physiological defence mechanism named the unfolded protein response (UPR) (15–18). The main role of UPR is to limit protein synthesis in order to reduce protein accumulation in the ER (22,23). UPR can lead to apoptosis if its action is insufficient (23). It is constituted of three interconnected pathways led by the Inositol-Requiring Enzyme 1 α (IRE1 α) (24), the Protein kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK) (25) and the Activating Transcription Factor 6 (ATF6) (26,27). These three arms are kept inactive by the binding of Grp78 to each actor which are anchored in ER's membrane (22,28). Under stress conditions, Grp78 dissociates from these three actors and binds to the unfolded proteins in the ER's lumen. Once released from GrP78, the three actors of the UPR can then activate.

PERK is activated by its homo-oligomerization and transphosphorylation which induce eIF2 α phosphorylation (16). This phosphorylation induces a decrease in the global protein synthesis in cells, but increase the expression of genes involved in the triggering of apoptosis (29). IRE1 α signalling is composed of three processes which are the IRE1-dependent decay that alleviates the ER protein overload (30), the endoribonuclease activity for the XBP1 splicing (XBP1s) leading to the expression of some target genes (31), and the kinase activity leading to the activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) pathway through the apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) (32). ATF6 migrates to the Golgi apparatus after the dissociation of Grp78, anchors the membrane of the Golgi apparatus and undergoes two successive cleavages by two serine proteases: the membrane-bound transcription factor site-1 protease (MBPT1) and the membrane-bound transcription factor site-2 protease (26,33,34). ATF6 is then released in its active form as a transcription factor that migrates to the nucleus in order to activate the

transcription of the UPR's genes (35–37). Importantly, ATF6 also inhibits some genes including CFTR (38,39).

We previously showed the specific involvement of ATF6 in the CFTR's synthesis in adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells (A549) expressing p.Phe508del-CFTR. We used siRNA to decrease the expression of ATF6 and we observed increased chloride currents via p.Phe508del-CFTR due to an increased amount of the proteins within the membranes (20). More recently, we used the anti-serine protease 4-[(Diethylamino)methyl]-N-[2-(2-methoxyphenyl)ethyl]-N-(3R)-3-pyrrolidinyl-benzamide dihydrochloride (PF-429242; PF) (40) in a human bronchial epithelial cell line (CFBE41o-) transduced to overexpress either the WT-CFTR or the p.Phe508del-CFTR (41). PF is a specific and reversible MBTP1's inhibitor which is critical for the activation of ATF6 (35,42). As with the siRNA, we observed an increased expression and an increased membrane localization of p.Phe508del-CFTR, leading to increased CFTR-dependent chloride efflux (20,40). More recently, we confirmed these results in non-transduced native CFBE41o- cells which are more relevant in UPR studies and in CF studies. We also observed increased chloride efflux linked to p.Phe508del-CFTR in reconstituted human bronchi homozygous for the p.Phe508del mutation (cf Résultats I.).

For few years, researches have been initiated to know how the p.Phe508del-CFTR can reach the plasma membrane (43,44). The p.Phe508del-CFTR protein is unable to validate the ER quality control steps and to reach the plasma membrane through the conventional pathway. However, beside this conventional protein secretion process (45,46), an unconventional protein secretion (UPS) pathway has been described, triggered in ER stress condition or in ER-to-Golgi blockage (47–49). UPS allows mutated proteins to reach their final location by different mechanisms bypassing the Golgi. It concerns misfolded proteins bearing a signal peptide sequence or transmembrane domain (45,50).

GRASP55 is involved in the p.Phe508del-CFTR transport through UPS, under stress condition (47). GRASP55 was initially identified as a structural protein allowing the Golgi apparatus cisternae's formation (51,52). Nevertheless, GRASP is also involved in soluble protein secretion in mammalian cell lines (47). Regarding p.Phe508del-CFTR, when UPR is triggered, the core-glycosylated form of the protein is more efficiently transported to the plasma membrane. This is due to an IRE1 α -dependant overexpression of GRASP55 and a direct interaction of GRASP55 with the PDZ domain p.Phe508del-CFTR (47). Therefore, IRE1 and GRASP55 are main actors triggering UPS in CF cells. Some studies showed the involvement of Sec16A, a protein located in ER exit sites and participating in the conventional secretion pathway through COP-II vesicles formation (53–55). They showed that Sec16A, regulated by IRE1 α (56,57), allowed the p.Phe508del-CFTR unconventional transport through its direct binding with GRASP55 (58).

Moreover, it was shown that some early autophagy components are also involved in p.Phe508del-CFTR translocation to the cell surface (59).

Autophagy is an evolutionarily conserved mechanism initially described as a degradative process through the intervention of double membrane structure named autophagosome which contains cargo proteins to be degraded after an autophagosome / lysosome fusion. This usually occurs when cells are stressed. So like UPR, autophagy is mostly a protective mechanism to maintain cellular homeostasis.

The activation of autophagy occurs through the ULK1 complex activation. There are two key regulators of this complex: the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and the adenosine monophosphate protein kinase (AMPK). mTORC1 performs some inhibiting phosphorylation on ULK1 complex components in order to impede its formation (60–62). AMPK is the main negative regulator of mTORC1 (63). AMPK can also phosphorylate ULK1 complex components to speed up its formation (64). This complex formation leads to Beclin-1/Bcl-2 dimer dissociation through Beclin-1 phosphorylation. Beclin-1 is able to bind three others proteins in order to form the PI3KC3 (class III phosphatidylinositol 3-kinase) complex which allows PI3P production, a lipid involved in phagosome membrane nucleation (60,65). Another important actor is the microtubule-binding protein-1 Light-Chain-3 (LC3) which is used as an autophagy activator hallmark. LC3 has two distinct forms: LC3-I (cytosolic form) and LC3-II which is associated with phosphatidylethanolamine (PE) allowing the phagophore membrane elongation (60,66,67).

Some studies have described autophagy as a main process in soluble protein transport (68,69). Indeed, it was shown that ULK1 activates Sec16A in the absence of stress conditions (70). Interestingly, the use of siRNA directed against some central components of the autophagosomes formation impedes the p.Phe508del-CFTR transport to the plasma membrane (47). Knowing that autophagosomes biogenesis occurs close to ER exit sites (71) where the COP-II vesicles are formed, and that previous studies showed that UPR activates autophagy (72,73), this gives many reasons to decipher the involvement of autophagy early components in UPS in link with p.Phe508del-CFTR.

As mentioned before, we previously showed that MBTP1 inhibition lead to an increased membrane expression and chloride efflux of p.Phe508del-CFTR (cf Résultats I.) In the present study, we sought to determine whether these beneficial effects were due to the autophagy-related UPS.

Materials and methods

Cell culture and treatments

The native CFBE41o- cells were cultured as previously described (74). These cells are immortalized human bronchial epithelial cells, derived from a CF patient homozygous for the p.Phe508del mutation (75–77). In some experiments, cells were treated with PF-429242 (PF; SML0667, Sigma-Aldrich : 10 μ M for 48 hours) with or without thapsigargin (Tg : #10798352, Acros Organics; 0.5 μ M for 4 hours), after PF treatment. The combination of PF and Tg was

performed in order to assess a potential protective effect of PF on the development of a subsequent stress.

RNA extraction and Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNAs from untreated and treated cells were extracted using NucleoSpin RNA plus columns, according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel). Reverse transcription was performed with the SuperScript® II reverse transcriptase (Invitrogen) using 1 µg of total RNAs. The cDNA synthesis was performed with a HotStarMastermix (Qiagen). The XBP1's primers were : forward: 5'- cagcgcttggggatggatgc and reverse: 5'- gggcttggatatatgtgg. These primers amplify both unspliced and spliced mRNA species. The thermal cycling conditions were 95°C for 15 minutes followed by 40 cycles at 94°C for 30 seconds, 61°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute and a final extension at 72°C for 10 minutes.

Protein extraction and western blotting

Cells were lysed in RIPA buffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % Na-Deoxycholate, 0,1 % SDS, 10 mM iodoacetamide, 100 mM PMSF; pH = 7,5) in the presence of the EDTA-free Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Cell lysates were centrifuged (15 min, 16.000 g, 4°C) and protein concentrations were determined by the Lowry's methodology. For blotting, samples were subjects to 10 %, 12 % or gradient 4-20 % SDS/PAGE gels. The membranes were incubated with anti-IRE1α (1/1000^e, #3294, Cell Signalling Technology), anti-pIRE1α (1/1000^e, ab48187, Abcam), anti-XBP1s (1/1000^e, #12782, Cell Signalling Technology), anti-LC3B (1/2000^e, #2775, Cell Signalling Technology) and anti-LAMP-1 (1/1000^e, D2D11, Cell signalling technology) antibodies. Blots were further incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (1/2000^e, anti-mouse and 1/20000^e, anti-rabbit were from Santa Cruz Biotechnology and Sigma-Aldrich, respectively) and visualized by enhanced chemiluminescence. Densitometric measurements were performed using Image Studio Lite software (LI-COR Biosciences, Version 5.2). Each value was normalized by the amount of β-Actin detected on the same immunoblots (anti-β-Actin-HRP, 1/20000^e, sc-47778, Santa Cruz Biotechnology).

Human protein autophagy array

Screening of 20 proteins involved in autophagy mechanism was performed using a Human Autophagy Array (#AAH-ATG-1-8, RayBiotech), according to the manufacturer's instructions. Each membrane contained specific antibodies for twenty autophagy proteins concentrated in dots. Saturation of the membranes was done with the Blocking buffer for 30 minutes. Cell lysates were added on membranes (600µg proteins) and incubated overnight in rotation at 4°C. Washes steps were performed using Wash buffers provided in the kit. Biotinylated antibody cocktail was added and incubated for 2 hours at room temperature. Washes steps were performed again and HRP-Streptavidin solution were added for 2 hours at

room temperature. A final wash step was performed and we processed to the chemiluminescence detection. Densitometric analysis of the plots was performed using Image Studio Lite software (LI-COR Biosciences, Version 5.2).

Statistical analysis

Results are expressed as mean + SEM. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.01 software. Unpaired Student's t test and Mann-Whitney U-test were employed. Data were considered statistically significant when $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***).

Results

MBTP1 inhibition increases the expression and the phosphorylation of IRE1 α

UPR pathways being interconnected, we assess the expression and the phosphorylation state of IRE1 α after the inhibition of ATF6. Fig. 1A is a representative image of the expression of IRE1 α after PF treatment or Tg treatment or both. Conditions with PF increase the intensity of bands linked to the detection of IRE1 α . The bar graph shown in Fig. 1C represents the statistical analysis performed after the densitometric measurement. In the presence of PF we observed a significant increase of the expression of IRE1 α in comparison to the control condition. In the Tg condition, an upward trend in comparison to the control was observed. Moreover, the presence of both PF and Tg led to a significant increase of the IRE1 α 's expression in comparison to PF and Tg treatments alone and control condition.

Further, we assessed the phosphorylation state of IRE1 α in the same conditions (Fig. 1B and 1D). Fig. 1B is a representative image of an immunoblot showing an increased intensity of the bands related to the detection of the phosphorylated form of IRE1 α after PF or Tg or both treatments. A very faint intensity of the band in control condition is detected. Statistical analysis shows that the conditions comprising PF significantly increase the phosphorylation state of IRE1 α in cells, in comparison to the control. Tg treatment leads to an upward trend which is not statistically significant (Fig. 1D).

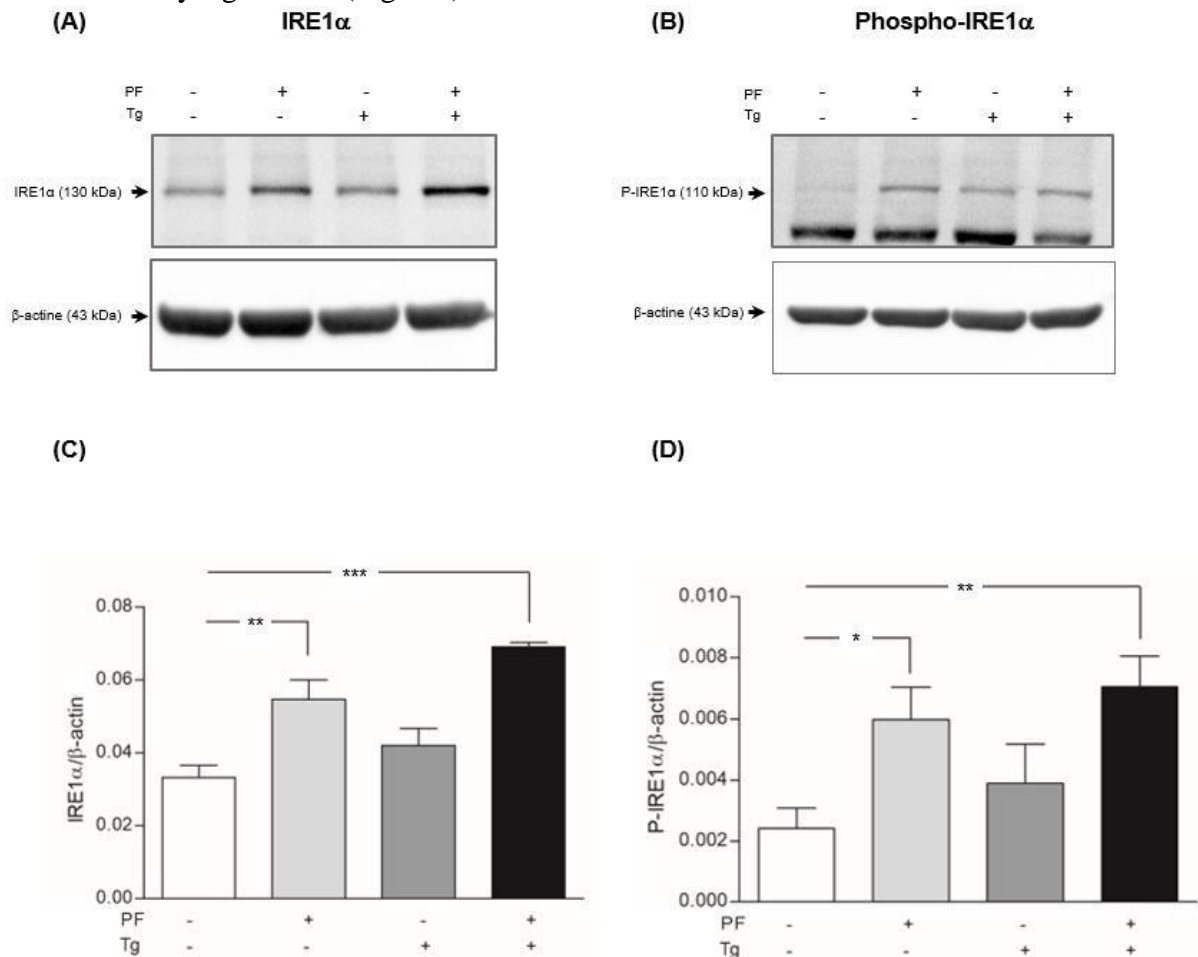


Fig. 1. MBTP1 inhibition induces IRE1 α autophosphorylation. (A and B) Representative immunoblots of IRE1 α (A) and phosphorylated IRE1 α (B) after CFBE41o- cells were treated with PF (10 μ M, 48 H), Tg (0,5 μ M, 4 H) or with the two molecules (n=4). β -actin was detected to show that the loading was identical in each lane and for further normalization. (C and D). Bar graphs represent the statistical analysis of the global expression of IRE1 α (C). Bar graphs represent the statistical analysis of the phosphorylation of IRE1 α (D). Data are shown as mean \pm SEM of four to seven independent experiments. Unpaired student t-test was performed to show the significant overexpression and phosphorylation of IRE1 α in comparison to control conditions. *: P < 0,05, **: P < 0,01 and *** : P < 0,001.

XBP1 is activated after MBTP1 inhibition

One of the downstream effects of IRE1 α activation is its endoribonucleasic process, represented by the cleavage of XBP1. We show, at the mRNA level, XBP1s is increase after MBTP1 inhibition using PF (Fig. 2A). We confirmed this result by performing immunoblots to detect XBP1s at the protein level (Fig. 2B). Unsurprisingly, the expression of XBP1s is significantly increased after UPR induction by Tg. In the presence of PF with or without Tg show an increased intensity of the band related to XBP1s detection in comparison to control, but less than Tg alone. The Association of both PF and Tg do not lead to an additive effect on the level of expression of XBP1s but rather to a return to the same expression level of XBP1s as in condition with PF alone.

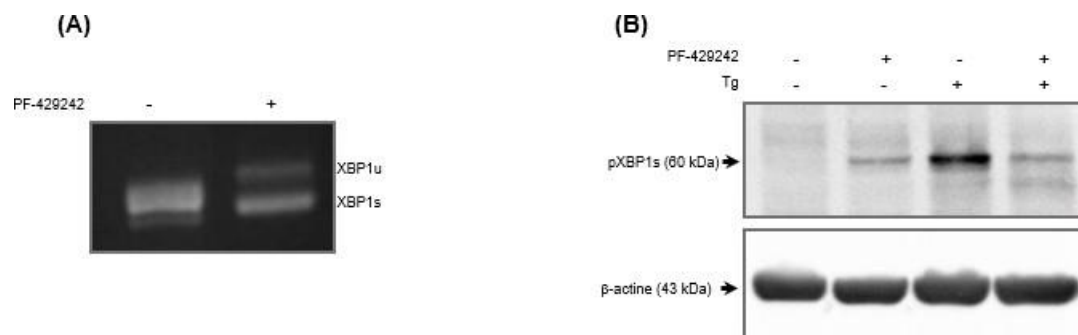


Fig. 2. XBP1 mRNA is spliced by IRE1 α in response to MBTP1 inhibition. XBP1 mRNA splicing (A) was determined by conventional RT-PCR, using primers that amplify both unspliced and spliced mRNA species. The image shows representative PCR bands for XBP1u and XBP1s after resolution in 4 % agarose gel prestained with BET. Splicing of XBP1 mRNA results in the translation of two distinct XBP1 protein isoforms: spliced (pXBP1s) and unspliced (pXBP1u). The image in (B) is a representative immunoblot of the detection of XBP1s in CFBE41o- cells treated with PF (10 μ M, 48 H), Tg (0,5 μ M, 4 H) or with the two molecules (n=4). β -actine was detected for normalization. Images are representative of three independent experiments.

Upregulation of autophagy components after MBTP1 inhibition

We next assess the effect of MBTP1's inhibition on the autophagy process. We screened the expression of twenty proteins known to be involved in the autophagy process. After PF treatment, we show that two proteins are significantly upregulated: LC3A and LAMP-1 (Fig. 3), what was confirmed by western blots (Fig.4). In the case of LC3A, we show a significant increase in its expression after PF treatment. Whereas it isn't observed in the presence of Tg, its expression is likely increased. PF plus Tg condition lead to a significant overexpression of LC3 in comparison to control and Tg alone conditions (Fig. 4A and 4C). LAMP-1 is significantly overexpressed in all conditions containing PF. Tg do not appear to induce any variation in LAMP-1 expression (Fig. 4B and 4D).

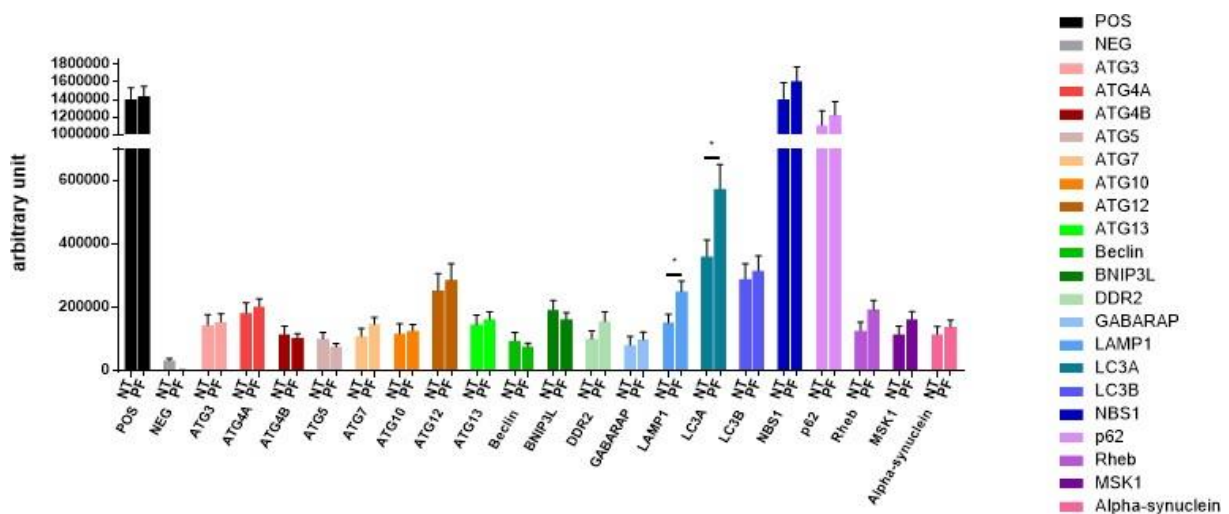


Fig. 3. Inhibition of MBTP1 increases the expression of the autophagy proteins LC3A and LAMP-1. Human autophagy proteins array was performed in order to screen twenty proteins expression known to be involved in autophagy process (n=4). LC3A and LAMP-1 were overexpressed after the inhibition of MBTP1. Bar graphs represent the statistical analysis. *: P < 0,05

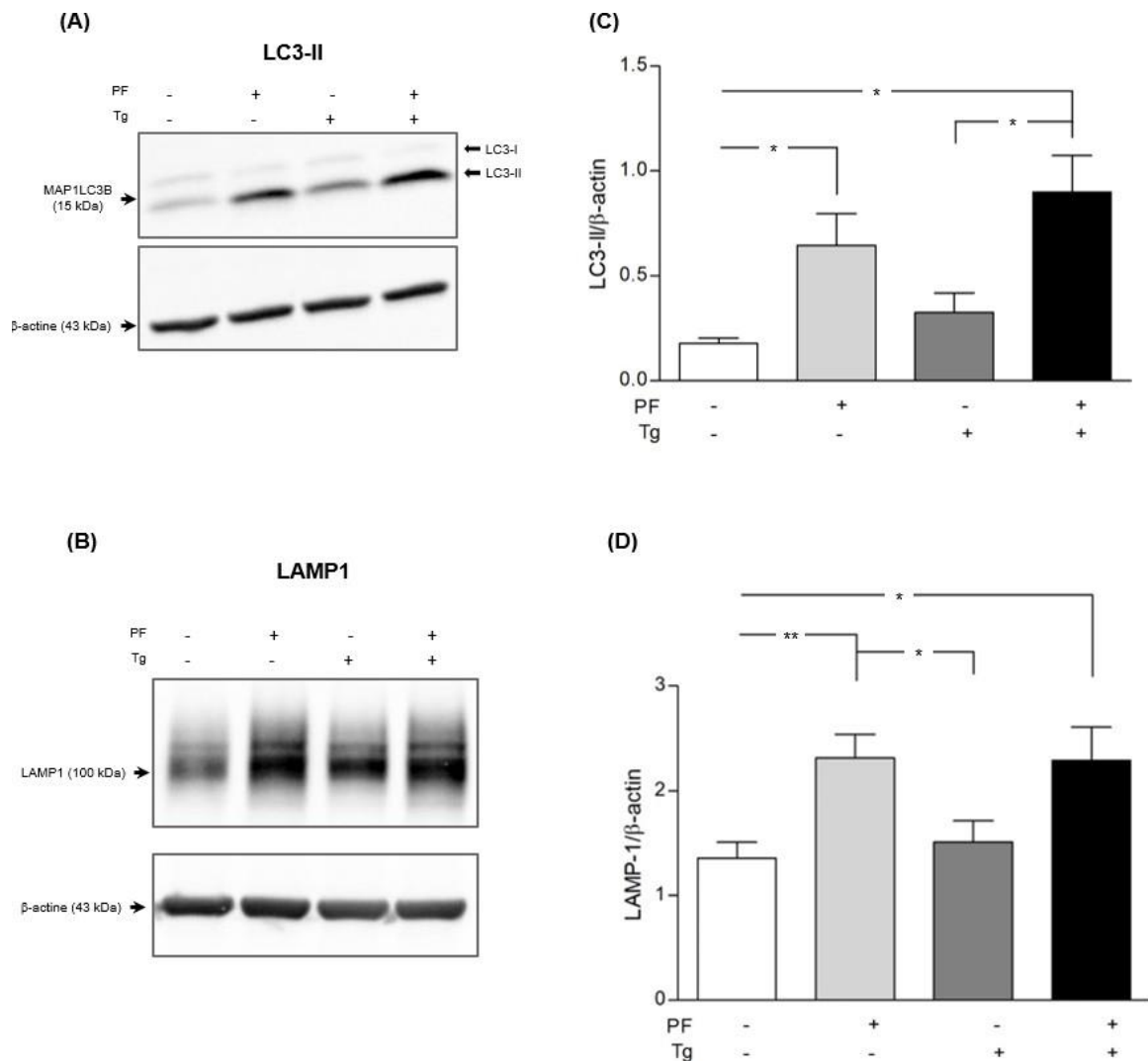


Fig. 4. MBTP1 inhibition modifies the expression of some autophagy's actors. (A-B). Representative immunoblots of LC3B (A) and LAMP-1 (B) expression in CFBE41o- cells treated with PF (10 μ M, 48 H), Tg (0,5 μ M, 4 H) or with the two molecules. β -actine was detected for normalization. (C-D). Bar graph representation of the statistical analysis of the expression of LC3B-II (C) and LAMP-1 (D). *: $P < 0,05$ and **: $P < 0,01$

Discussion

In a previous study, we showed that ATF6 inhibition, through MBTP1 inhibition, increases the global and membranous expression of p.Phe508del-CFTR (20,40) (cf Résultats I.). This leads to an increased chloride efflux via p.Phe508del-CFTR. After the identification of genes that could explain this mechanism, we hypothesized that the beneficial effect of MBTP1's inhibition is due to the triggering of the UPS.

Hence, we show that PF increases the expression of IRE1 α . as well as its phosphorylation. It is known that all UPR pathways are interconnected, it is not surprising that ATF6 inhibition leads to an increased IRE1 α 's phosphorylation by a compensatory mechanism (78,79). IRE1 α is described as one of the main regulators of UPS (47,57–59). Therefore, we sought to determine whether the endoribonuclease activity of this pathway is triggered by studying the splicing of XBP1. We showed an increased expression of XBP1s after PF treatment, at both the mRNA and protein levels, indicating that the endoribonuclease activity of IRE1 is indeed activated. Tg plus PF treatment of the cells did not increase the expression of XBP1s to the level observed with Tg alone. ATF6 controls XBP1 expression, therefore it is possible that inhibition of ATF6 indirectly controls the amount of XBP1s since the overall amount of XBP1 is reduced (80). XBP1s enables the synthesis of chaperone proteins that allow the degradation of misfolded proteins (81,82). XBP1s has also been shown to be involved in the unconventional transport of p.Phe508del-CFTR (72,83). These two effects could regulate the amount of p.Phe508del-CFTR in the lumen of the ER by maintaining a balance between its degradation and its exit from this organelle.

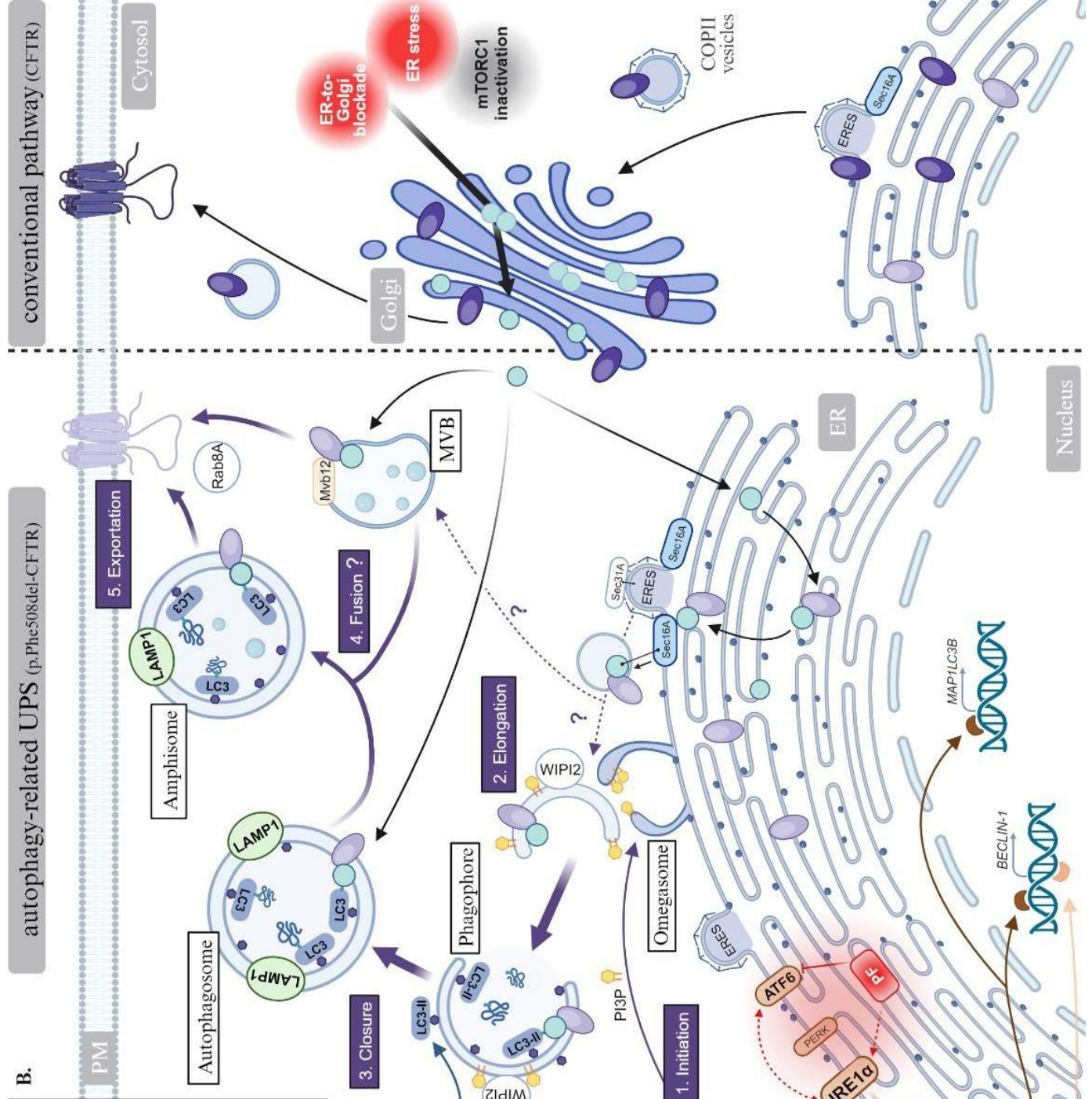
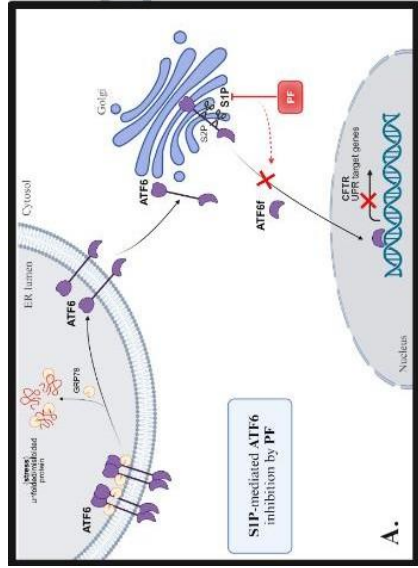
We then sought to determine whether certain proteins known to be involved in the autophagy process were modulated in our context. Two proteins out of twenty were significantly overexpressed: LC3A and LAMP-1.

LC3 is part of the ATG8 protein family (84). It is involved in the elongation of the autophagosome's membrane. Finding out why LC3A is only overexpressed here could be an interesting avenue for future research. Indeed, the different locations and mobility in cells of the various LC3 homologs may mean that they have different functions (85). To our knowledge, no study has looked into this question, and those using LC3 as a marker of autophagy do not differentiate between the homologs. The results reported here may mean that LC3A is specific or at least plays a more significant role than its homologues in the formation of autophagosomes for the secretion of misfolded proteins.

LAMP-1, along with its homologue LAMP-2, is known to represent 50% of the membrane of lysosomes. It is therefore regularly used as a marker of autophagy activation (86). Recently, it has been reported that LAMP-1 is also found in the trans-Golgi network. This protein is thought to be one of the potential effectors enabling cargo proteins to leave this organelle and join the plasma membrane. In other words, LAMP-1 appears to be involved in the formation of lipid structures for conventional transport (87). Beside this, it is known that autophagosomes form at a structure called phagophore assembly site (88). The formation of this structure is conditioned by the arrival of vesicles that supply the lipids involved in the elongation of the autophagosome membrane. These vesicles may originate from various cellular locations, including the Golgi apparatus or the plasma membrane (89). Since LAMP-1 is found in the Golgi apparatus to form lipid structures for transporting proteins to the plasma membrane, we can suppose that this protein also plays a role in supplying lipids to phagophore assembly sites.

We have provided some information on the mechanism by which p.Phe508del-CFTR is delivered to the membrane in the case of MBTP1 inhibition, in a relevant model to CF. Figure 5 shows a model explaining the effects of MBTP1 inhibition on the unconventional transport of p.Phe508del-CFTR. Some of the effectors represented have not been studied in this study. However, their involvement in UPS is well known in the literature, and we have chosen to include them in order to give an overview of the potential benefits of ATF6 inhibition through MBTP1 blockade.

Many aspects remain to be clarified. One of the next priorities will be to look at the behaviour of IRE1 α kinase activity in our context. It has been reported that this pathway has a predominant effect on the transport of p.Phe508del-CFTR through the UPS (47,57–59). Furthermore, we did not explore the effect of the PERK pathway at all in this study. A few studies have highlighted its importance in this subject (72,83), so investigating whether this pathway is involved in our case could provide more informations.



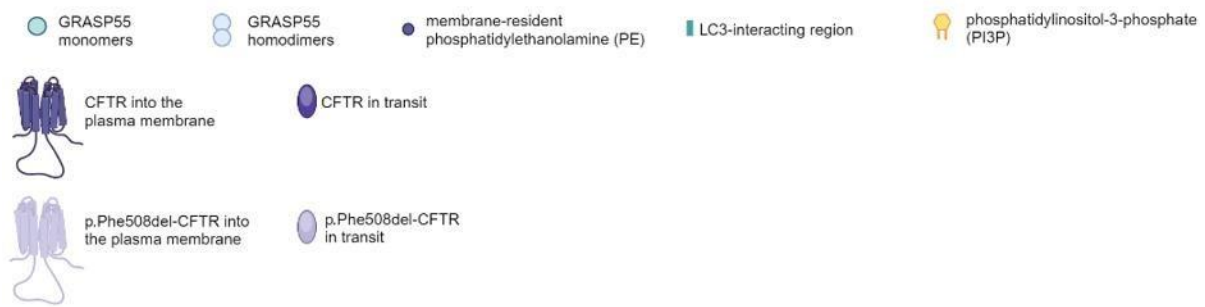


Fig. 5. Proposed autophagy-related UPS model for p.Phe508del-CFTR after MBTP1 inhibition.

In a healthy physiological context, CFTR is transported from the ER to the plasma membrane via the Golgi apparatus, using the conventional protein secretion pathway (B., right side). An unconventional protein secretion (UPS) pathway has been reported for the transport of the p.Phe508del-CFTR, activated in ER stress condition or in ER-to-Golgi blockade and bypassing the Golgi apparatus. Bypassing the Golgi, it is mediated by GRASP55 and the UPR transducer IRE1 α and named unconventional protein secretion (UPS). This pathway was initially described as being triggered by GRASP55 under the control of IRE1, and then early components of autophagy were shown to be involved in this process, regularly referred to the autophagy-related UPS. Briefly, autophagy is initiated (1) at the phagophore assembly sites (PAS) with the phagophore nucleation. Phosphorylation mediated by mTORC1 and AMPK, the two main regulators of autophagy, leads to the formation of the ULK1 complex. In association with certain proteins of the ATG family, the PI3KC3 complex can then form and produce PI3Ps, which are crucial lipids in the elongation of the autophagosome membrane (2). Another important actor participating to autophagosome maturation (2, 3) is LC3 found in two forms: LC3-I (cytosolic form) and LC3-II conjugated with PE. Importantly, changes in the phosphorylation status of GRASP55 by certain stimuli (e.g. mTORC1 inactivation) can redirect its location to other sites as the ER, autophagosomes or MVBs, enabling the UPS of p.Phe508del-CFTR. GRASP55 is acting in concert with others actors such as Sec16A, Sec31A, WIPI2, LC3-II, ATG proteins, RAB proteins and LAMP-1. Numerous interactions have been investigated and fusion events evoked to describe the exportation of p.Phe508del-CFTR to the plasma membrane. In our model, treatment with PF results in the MBTP1-mediated ATF6 inhibition, leading to an increase of the CFTR gene's expression [A.]. We propose that, via a compensation mechanism between the different UPR arms, inhibition of ATF6 promotes activation of the IRE1 α pathway. [B.]. IRE1 α kinase activity through the TRAF2-ASK1-JNK1 pathway could be implicated in the phosphorylation-dependent dissociation of Beclin-1/Bcl-2 complex, facilitating the activation of autophagy. Our results suggest a modification in the IRE1 α endoribonuclease activity through the transcription factor XBP1 and its regulation *LAMP-1* and *MAP1LC3A* genes (B).

Published under Biorender license (<https://www.biorender.com/academic-license>)

Acknowledgements : We would like to thank the Gaëtan Saleun association for its financial support and its contribution to RS's gratification. We also thank Brest-Métropole for

its contribution to RS's gratification. We are indebted to the Inserm, the Université de Bretagne Occidentale (UBO) and the EFS for their continuous support.

Conflict of interest : The authors declare no conflict of interest

Author contributions : PT conceived and supervised the study; RS and NB designed experiments; NB and RS performed experiments; PT, RS and NB analysed data; PT, RS and NB wrote the manuscript.

References

1. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science*. 1989;245(4922):1073-80.
2. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 8 sept 1989;245(4922):1066-73.
3. Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, et al. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature*. sept 1990;347(6291):358-63.
4. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science*. 12 juill 1991;253(5016):202-5.
5. Smith JJ, Welsh MJ. cAMP stimulates bicarbonate secretion across normal, but not cystic fibrosis airway epithelia. *J Clin Invest*. avr 1992;89(4):1148-53.
6. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, et al. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*. 16 nov 1990;63(4):827-34.
7. Du K, Sharma M, Lukacs GL. The $\Delta F508$ cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR. *Nat Struct Mol Biol*. janv 2005;12(1):17-25.
8. Ward CL, Omura S, Kopito RR. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*. 6 oct 1995;83(1):121-7.
9. Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL, Riordan JR. Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell*. 6 oct 1995;83(1):129-35.
10. Amaral MD. CFTR and chaperones: processing and degradation. *J Mol Neurosci*. 2004;23(1-2):41-8.

11. Ward CL, Kopito RR. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem.* 14 oct 1994;269(41):25710-8.
12. Denning GM, Ostedgaard LS, Welsh MJ. Abnormal localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelia. *J Cell Biol.* 1 août 1992;118(3):551-9.
13. Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature.* août 1992;358(6389):761-4.
14. Rhim AD, Stoykova L, Glick MC, Scanlin TF. Terminal glycosylation in cystic fibrosis (CF): a review emphasizing the airway epithelial cell. *Glycoconj J.* sept 2001;18(9):649-59.
15. Liu CY, Kaufman RJ. The unfolded protein response. *J Cell Sci.* 15 mai 2003;116(Pt 10):1861-2.
16. Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D. Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:575-99.
17. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature.* 24 juill 2008;454(7203):455-62.
18. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:739-89.
19. Bartoszewski R, Rab A, Jurkuvenaite A, Mazur M, Wakefield J, Collawn JF, et al. Activation of the Unfolded Protein Response by $\Delta F508$ CFTR. *Am J Respir Cell Mol Biol.* oct 2008;39(4):448-57.
20. Kerbiriou M, Le Drévo MA, Férec C, Trouvé P. Coupling cystic fibrosis to endoplasmic reticulum stress: Differential role of Grp78 and ATF6. *Biochim Biophys Acta.* déc 2007;1772(11-12):1236-49.
21. Bartoszewski R, Rab A, Twitty G, Stevenson L, Fortenberry J, Piotrowski A, et al. The Mechanism of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Transcriptional Repression during the Unfolded Protein Response*. *Journal of Biological Chemistry.* 2 mai 2008;283(18):12154-65.
22. Haas IG, Wabl M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature.* 24 nov 1983;306(5941):387-9.
23. Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the Unfolded Protein Response from the Endoplasmic Reticulum*. *Journal of Biological Chemistry.* 18 juin 2004;279(25):25935-8.
24. Ali MMU, Bagratuni T, Davenport EL, Nowak PR, Silva-Santisteban MC, Hardcastle A, et al. Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response. *EMBO J.* 2 mars 2011;30(5):894-905.

25. McQuiston A, Diehl JA. Recent insights into PERK-dependent signaling from the stressed endoplasmic reticulum. *F1000Res*. 2017;6:1897.
26. Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem*. 12 avr 2002;277(15):13045-52.
27. Hai TW, Liu F, Coukos WJ, Green MR. Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev*. déc 1989;3(12B):2083-90.
28. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*. avr 2005;35(4):373-81.
29. Read A, Schröder M. The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology (Basel)*. 29 avr 2021;10(5):384.
30. Hollien J, Weissman JS. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science*. 7 juill 2006;313(5783):104-7.
31. Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 3 janv 2002;415(6867):92-6.
32. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, et al. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*. 1 juin 2002;16(11):1345-55.
33. Li M, Baumeister P, Roy B, Phan T, Foti D, Luo S, et al. ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1. *Mol Cell Biol*. juill 2000;20(14):5096-106.
34. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell*. juill 2002;3(1):99-111.
35. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell*. déc 2000;6(6):1355-64.
36. Cox JS, Shamu CE, Walter P. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*. 18 juin 1993;73(6):1197-206.
37. Zhu C, Johansen FE, Prywes R. Interaction of ATF6 and serum response factor. *Mol Cell Biol*. sept 1997;17(9):4957-66.
38. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 28 avr 2000;101(3):249-58.

39. Blohmke CJ, Mayer ML, Tang AC, Hirschfeld AF, Fjell CD, Sze MA, et al. Atypical activation of the unfolded protein response in cystic fibrosis airway cells contributes to p38 MAPK-mediated innate immune responses. *J Immunol.* 1 déc 2012;189(11):5467-75.
40. Huguet F, Guellec J, Kerbirou M, Gandy M, Thomas J, Férec C, et al. Evaluation of aminopyrrolidine amide to improve chloride transport in CFTR-defective cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 15 sept 2022;72:128866.
41. Gruenert DC, Basbaum CB, Welsh MJ, Li M, Finkbeiner WE, Nadel JA. Characterization of human tracheal epithelial cells transformed by an origin-defective simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci U S A.* août 1988;85(16):5951-5.
42. Trouvé P, Férec C, Génin E. The Interplay between the Unfolded Protein Response, Inflammation and Infection in Cystic Fibrosis. *Cells.* nov 2021;10(11):2980.
43. Rennolds J, Boyaka PN, Bellis SL, Cormet-Boyaka E. Low temperature induces the delivery of mature and immature CFTR to the plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 22 févr 2008;366(4):1025-9.
44. Luo Y, McDonald K, Hanrahan JW. Trafficking of immature $\Delta F508$ -CFTR to the plasma membrane and its detection by biotinylation. *Biochemical Journal.* 13 mars 2009;419(1):211-21.
45. Rabouille C. Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends Cell Biol.* mars 2017;27(3):230-40.
46. Kim J, Gee HY, Lee MG. Unconventional protein secretion - new insights into the pathogenesis and therapeutic targets of human diseases. *J Cell Sci.* 25 juin 2018;131(12).
47. Gee HY, Noh SH, Tang BL, Kim KH, Lee MG. Rescue of $\Delta F508$ -CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. *Cell.* 2 sept 2011;146(5):746-60.
48. Giuliani F, Grieve A, Rabouille C. Unconventional secretion: a stress on GRASP. *Curr Opin Cell Biol.* août 2011;23(4):498-504.
49. Jung J, Kim J, Roh SH, Jun I, Sampson RD, Gee HY, et al. The HSP70 co-chaperone DNAJC14 targets misfolded pendrin for unconventional protein secretion. *Nat Commun.* 25 avr 2016;7:11386.
50. Nickel W, Rabouille C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* févr 2009;10(2):148-55.
51. Barr FA, Puype M, Vandekerckhove J, Warren G. GRASP65, a Protein Involved in the Stacking of Golgi Cisternae. *Cell.* 17 oct 1997;91(2):253-62.
52. Shorter J, Watson R, Giannakou ME, Clarke M, Warren G, Barr FA. GRASP55, a second mammalian GRASP protein involved in the stacking of Golgi cisternae in a cell-free system. *The EMBO Journal.* 15 sept 1999;18(18):4949-60.
53. Hughes H, Budnik A, Schmidt K, Palmer KJ, Mantell J, Noakes C, et al. Organisation of human ER-exit sites: requirements for the localisation of Sec16 to transitional ER. *J Cell Sci.* 15 août 2009;122(Pt 16):2924-34.

54. Bhattacharyya D, Glick BS. Two mammalian Sec16 homologues have nonredundant functions in endoplasmic reticulum (ER) export and transitional ER organization. *Mol Biol Cell*. mars 2007;18(3):839-49.
55. Inuma T, Shiga A, Nakamoto K, O'Brien MB, Aridor M, Arimitsu N, et al. Mammalian Sec16/p250 plays a role in membrane traffic from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 15 juin 2007;282(24):17632-9.
56. Farhan H, Weiss M, Tani K, Kaufman RJ, Hauri HP. Adaptation of endoplasmic reticulum exit sites to acute and chronic increases in cargo load. *EMBO J*. 6 août 2008;27(15):2043-54.
57. Park H, Shin DH, Sim JR, Aum S, Lee MG. IRE1 α kinase-mediated unconventional protein secretion rescues misfolded CFTR and pendrin. *Sci Adv*. févr 2020;6(8):eaax9914.
58. Piao H, Kim J, Noh SH, Kweon HS, Kim JY, Lee MG. Sec16A is critical for both conventional and unconventional secretion of CFTR. *Sci Rep*. 9 janv 2017;7:39887.
59. Noh SH, Gee HY, Kim Y, Piao H, Kim J, Kang CM, et al. Specific autophagy and ESCRT components participate in the unconventional secretion of CFTR. *Autophagy*. 2018;14(10):1761-78.
60. Li W, Zhang L. Regulation of ATG and Autophagy Initiation. In: Qin ZH, éditeur. *Autophagy: Biology and Diseases: Basic Science* [Internet]. Singapore: Springer; 2019 [cité 19 juin 2023]. p. 41-65. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_2
61. Wang Y, Zhang H. Regulation of Autophagy by mTOR Signaling Pathway. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1206:67-83.
62. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*. avr 2009;20(7):1981-91.
63. Xu HD, Qin ZH. Beclin 1, Bcl-2 and Autophagy. In: Qin ZH, éditeur. *Autophagy: Biology and Diseases: Basic Science* [Internet]. Singapore: Springer; 2019 [cité 19 juin 2023]. p. 109-26. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_5
64. Li Y, Chen Y. AMPK and Autophagy. In: Qin ZH, éditeur. *Autophagy: Biology and Diseases: Basic Science* [Internet]. Singapore: Springer; 2019 [cité 23 juin 2023]. p. 85-108. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_4
65. Menon MB, Dhamija S. Beclin 1 Phosphorylation – at the Center of Autophagy Regulation. *Front Cell Dev Biol*. 12 oct 2018;6:137.
66. Hemelaar J, Lelyveld VS, Kessler BM, Ploegh HL. A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J Biol Chem*. 19 déc 2003;278(51):51841-50.

67. Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, et al. The Reversible Modification Regulates the Membrane-Binding State of Apg8/Aut7 Essential for Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. *J Cell Biol.* 16 oct 2000;151(2):263-76.
68. Bruns C, McCaffery JM, Curwin AJ, Duran JM, Malhotra V. Biogenesis of a novel compartment for autophagosome-mediated unconventional protein secretion. *J Cell Biol.* 12 déc 2011;195(6):979-92.
69. Zhang M, Kenny SJ, Ge L, Xu K, Schekman R. Translocation of interleukin-1 β into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion. *Elife.* 2 nov 2015;4:e11205.
70. Joo JH, Wang B, Frankel E, Ge L, Xu L, Iyengar R, et al. The Noncanonical Role of ULK/ATG1 in ER-to-Golgi Trafficking Is Essential for Cellular Homeostasis. *Mol Cell.* 16 juin 2016;62(6):982.
71. Graef M, Friedman JR, Graham C, Babu M, Nunnari J. ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *MBoC.* 15 sept 2013;24(18):2918-31.
72. Bhardwaj M, Leli NM, Koumenis C, Amaravadi RK. Regulation of autophagy by canonical and non-canonical ER stress responses. *Semin Cancer Biol.* nov 2020;66:116-28.
73. Bernales S, McDonald KL, Walter P. Autophagy Counterbalances Endoplasmic Reticulum Expansion during the Unfolded Protein Response. *PLOS Biology.* 28 nov 2006;4(12):e423.
74. Benz N, Le Hir S, Norez C, Kerbirou M, Calvez ML, Becq F, et al. Improvement of chloride transport defect by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in cystic fibrosis epithelial cells. *PLoS One.* 2014;9(2):e88964.
75. An immortalized cystic fibrosis tracheal epithelial cell line homozygous for the delta F508 CFTR mutation - PubMed [Internet]. [cité 30 juin 2021]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7683197/>
76. Illek B, Maurisse R, Wahler L, Kunzelmann K, Fischer H, Gruenert DC. Cl transport in complemented CF bronchial epithelial cells correlates with CFTR mRNA expression levels. *Cell Physiol Biochem.* 2008;22(1-4):57-68.
77. Bruscia E, Sangiuolo F, Sinibaldi P, Goncz KK, Novelli G, Gruenert DC. Isolation of CF cell lines corrected at DeltaF508-CFTR locus by SFHR-mediated targeting. *Gene Ther.* juin 2002;9(11):683-5.
78. Lebeau P, Byun JH, Yousof T, Austin RC. Pharmacologic inhibition of S1P attenuates ATF6 expression, causes ER stress and contributes to apoptotic cell death. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15 juin 2018;349:1-7.
79. Walter F, O'Brien A, Concannon CG, Düssmann H, Prehn JHM. ER stress signaling has an activating transcription factor 6 α (ATF6)-dependent "off-switch". *J Biol Chem.* 23 nov 2018;293(47):18270-84.

80. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 28 déc 2001;107(7):881-91.
81. Caruana BT, Skoric A, Brown AJ, Lutze-Mann LH. Site-1 protease, a novel metabolic target for glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 26 août 2017;490(3):760-6.
82. Lin JC, Liu TP, Chen YB, Yang PM. PF-429242 exhibits anticancer activity in hepatocellular carcinoma cells via FOXO1-dependent autophagic cell death and IGFBP1-dependent anti-survival signaling. *Am J Cancer Res*. 2023;13(9):4125-44.
83. Margariti A, Li H, Chen T, Martin D, Vizcay-Barrena G, Alam S, et al. XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation. *J Biol Chem*. 11 janv 2013;288(2):859-72.
84. Membrane association of the ATG8 conjugation machinery emerges as a key regulatory feature for autophagosome biogenesis - Tooze - *FEBS Letters* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 28 déc 2023]. Disponible sur: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14676>
85. Baeken MW, Weckmann K, Diefenthaler P, Schulte J, Yusifli K, Moosmann B, et al. Novel Insights into the Cellular Localization and Regulation of the Autophagosomal Proteins LC3A, LC3B and LC3C. *Cells* [Internet]. oct 2020 [cité 6 oct 2023];9(10). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7603224/>
86. Eskelinen EL. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular Aspects of Medicine*. 1 oct 2006;27(5):495-502.
87. Stalder D, Gershlick DC. Direct trafficking pathways from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *Semin Cell Dev Biol*. nov 2020;107:112-25.
88. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*. oct 2007;9(10):1102-9.
89. Ghanbarpour A, Valverde DP, Melia TJ, Reinisch KM. A model for a partnership of lipid transfer proteins and scramblases in membrane expansion and organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 avr 2021;118(16):e2101562118.

Résultats préliminaires :

Aucune variation d'expression de la Beclin-1 n'a été observée lors de notre screening, nous avons voulu vérifier ce résultat par western blots (Figure 1A). Il s'avère que ni le PF ni la thapsigargine ne font varier son expression (Figure 1B).

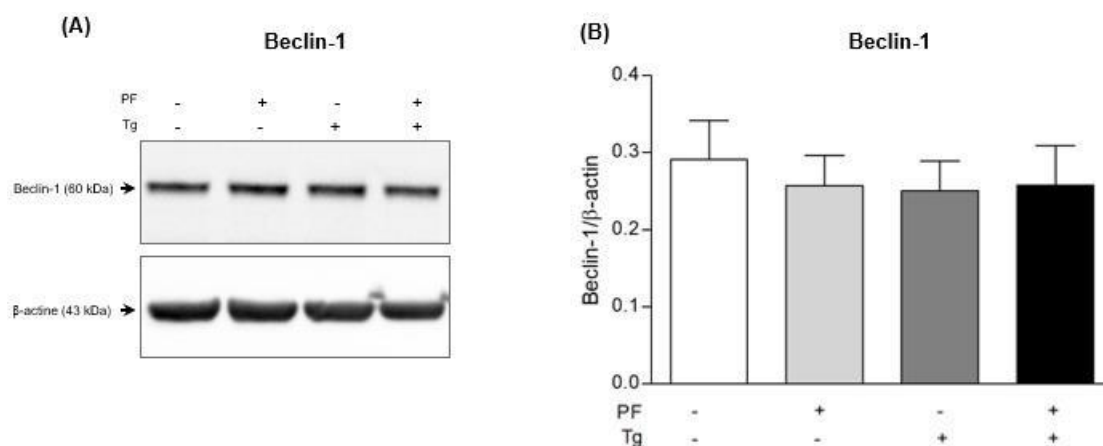


Figure 1 : L'expression de la Beclin-1 n'est pas modifiée après inhibition de la S1P.

(A) Image représentative d'un gel utilisé pour détecter l'expression de la Beclin-1 (image du haut). La β -actine a été détectée pour vérifier l'homogénéité des dépôts protéiques (image du bas), et utilisée pour la normalisation des résultats. (B) Histogramme représentant les analyses statistiques de l'expression de la Beclin-1 (n=3). Aucune condition de traitement n'a montré d'augmentation de l'expression de la Beclin-1.

Anticorps utilisés : anti-Beclin-1 (1/1000^{ème}, D40C5, Cell Signalling Technology) et anti-Actin-HRP (1/20000^{ème}, sc-47774, Santa Cruz Biotechnology).

Il est étonnant que l'expression protéique de la Beclin-1 ne soit pas augmentée. En effet, de précédentes études avaient montré que XBP1s pouvait jouer sur la transcription de son gène, tout comme celui de LC3 (371,372). L'expression protéique de ce dernier est pourtant augmentée dans notre contexte. Il faudrait vérifier si l'ARNm de la Beclin-1 est plus synthétisé après avoir inhibé la S1P. De plus, étudier la phosphorylation de la Beclin-1 serait également un bon moyen de savoir si son activité est augmentée. Au moment où j'écris ces lignes, des expériences visant à étudier son état de phosphorylation sont en cours de réalisation. Des prémisses de résultats que nous avons obtenus, qui ne sont pas présentés ici, nous font penser que la forme phosphorylée de la Beclin-1 est augmentée sous traitement au PF.

Nous avons ensuite étudié le cas de GRASP55 (Figure 2), une des premières protéines étudiées dans ce contexte. Son expression globale n'est pas modifiée après avoir appliqué un traitement au PF. Cependant, la thapsigargine diminue significativement son expression par rapport au contrôle. Cet effet est exacerbé quand l'association PF plus thapsigargine est appliquée (Figure 2A panel du haut et Figure 2B). Son état de phosphorylation a également été étudié (Figure 2A panel du milieu et Figure 2C). Une forte diminution de celui-ci a été observée

après un traitement à la thapsigargine avec ou sans PF, mais sans significativité. Un traitement au PF seul ne modifie pas l'état de phosphorylation de GRASP55.

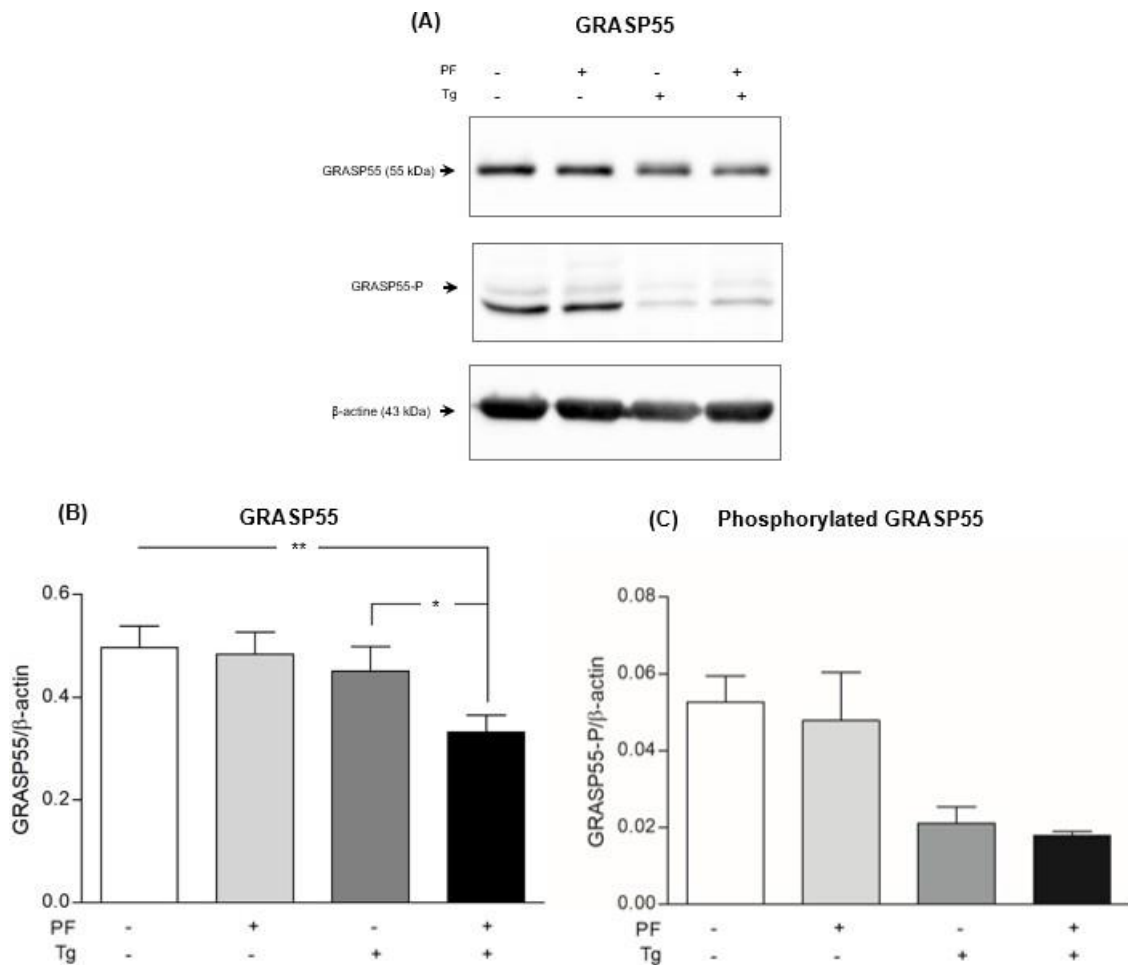


Figure 2 : L'expression et le taux de phosphorylation de GRASP55 ne varie pas après avoir inhibé la S1P et diminue en présence de thapsigargine.

(A) Image représentative d'un gel utilisé pour détecter l'expression de GRASP55. L'image du haut correspond à la détection de sa forme totale et celle du milieu de sa forme phosphorylée. La β-actine a été détectée pour vérifier l'homogénéité des dépôts protéiques (image du bas), et utilisée pour la normalisation des résultats. (B) Histogramme représentant les analyses statistiques de l'expression globale de GRASP55 (n=3). (C) Histogramme représentant les analyses statistiques de l'état de phosphorylation de GRASP55 (n=3). *: P < 0,05 et **: P < 0,01.

Anticorps utilisés : anti-GRASP55 (1/1000^{ème}, ab204335, Abcam) et anti-Actin-HRP (1/20000^{ème}, sc-47774, Santa Cruz Biotechnology).

Les résultats obtenus sont inattendus. En effet, le PF n'augmente ni l'expression globale ni la phosphorylation de GRASP55. Cela est étonnant puisque nous avons montré une hausse d'expression membranaire de p.Phe508del-CFTR, et GRASP55 semble être un acteur vital dans

ce processus (266). Plus surprenant encore, la thapsigargine réduit l'expression globale du GRASP55 mais aussi son état de phosphorylation.

Des études ont cependant présenté des résultats pouvant expliquer cela. Une première a montré qu'un traitement de six heures à la thapsigargine n'augmentait pas la production de l'ARNm de GRASP55, mais que cela était le cas au bout de vingt-quatre heures (373). Deux autres études ont montré qu'un traitement court à la thapsigargine suffisait à phosphoryler GRASP55 et à induire sa délocalisation de l'appareil de Golgi (266,324).

Dans notre cas, il se pourrait que GRASP55 soit phosphorylé suite à notre traitement à la thapsigargine, ce qui l'amène à être relocalisé jusqu'au RE. A ce stade, GRASP55 se lierait au p.Phe508del-CFTR et lui permettrait d'emprunter l'UPS pour atteindre la membrane plasmique. Le fait que nous traitons pendant un temps court, et à une concentration faible, pourrait ne pas être suffisant pour déclencher l'expression du gène codant GRASP55. La cellule n'aurait alors pas le temps de déclencher sa synthèse pour compenser la quantité utilisée. Cependant, cela n'explique pas pourquoi l'inhibition de la S1P ne joue ni sur l'expression ni sur l'état de phosphorylation de GRASP55, semblant pourtant être nécessaire au transport membranaire du p.Phe508del-CFTR (266). Peut-être que l'inhibition de la S1P déclenche l'activation d'autres acteurs qui seraient eux aussi impliqués dans ce processus, en lien ou non avec GRASP55.

Discussion

La mucoviscidose est la maladie génétique létale à transmission autosomale récessive la plus retrouvée dans la population européenne. Elle est due à de nombreuses mutations altérant le gène *CFTR*, qui code pour un canal ionique homonyme perméable notamment aux ions Cl⁻ et bicarbonates (259–261). Les dysfonctionnements du CFTR liés à ces mutations engendrent notamment une déficience de son activité. Un déséquilibre osmotique se crée entre le milieu intra et extracellulaire, causant un épaissement du mucus qui se situe à la surface des cellules épithéliales. Ce mucus est la première barrière séparant l'organisme d'agents extérieurs potentiellement pathogènes. En temps normal, ce mucus est régulièrement renouvelé grâce à l'action de cils se situant au pôle apical des cellules épithéliales. Cet épaissement diminue l'efficacité de ce processus, nommé clairance mucociliaire, entraînant une stagnation du mucus au niveau des systèmes respiratoire, intestinal et génital (327). Ces lieux deviennent alors un terrain propice aux infections liées à la prolifération de microorganismes, et sont le théâtre d'une réponse inflammatoire exacerbée (103,306). Dans le cas de la mutation p.Phe508del-*CFTR*, une accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE est aussi observée (105,310). Le développement de ces trois paramètres principaux engendre un stress cellulaire régulé par la mise en place de l'UPR, un mécanisme de défense visant à restaurer l'homéostasie cellulaire (108).

L'UPR est régulé par trois voies de signalisation interconnectées, chacune représentée par une protéine : ATF6 (113,114), PERK (116) et IRE1 (115). Ces trois protéines sont, sous forme inactive, ancrées dans la membrane du RE et liées à la protéine chaperon Grp78 (129–131). Une fois activées, les objectifs principaux de ces trois voies sont de réduire la synthèse globale des protéines d'une part (9), et d'augmenter la synthèse de protéines chaperons et de protéines impliquées dans l'ERAD d'autre part (108–110). Si ces effets ne suffisent pas, l'UPR peut déclencher l'activation du programme de mort cellulaire par apoptose, dans le but de préserver le reste de l'organisme (111,112).

Dans mon projet de thèse, je me suis tout particulièrement intéressé à la voie ATF6, car de précédentes études avaient montré que l'activation de cette voie inhibait l'expression du gène *CFTR* (367,368). En effet, une fois sous sa forme active, ATF6 agit comme facteur de transcription. Pour être activé, il faut qu'un paramètre déclencheur de l'UPR permette la dissociation de Grp78 de ATF6 (130,150,151). Grp78 se fixe aux protéines mal formées situées dans la lumière du RE, permettant à ATF6 de migrer jusqu'à l'appareil de Golgi (152). ATF6 y subit deux clivages successifs par les sérines protéases S1P et S2P (153). Une fois ces clivages réalisés, ATF6 est libérée dans le cytosol sous sa forme active, et transloque au travers de la membrane nucléaire afin de moduler l'expression de ses gènes cibles (104,155).

La mucoviscidose a été décrite depuis longtemps, mais aucun traitement curatif n'a pour le moment été développé. Néanmoins, des avancées significatives dans les traitements prescrits aux patients ont été réalisées ces vingt dernières années. En effet, parmi les molécules qui constituent le Trikafta/Kaftrio®, la trithérapie protéique actuelle, les correcteurs permettent de restaurer en partie le transport du CFTR jusqu'à la membrane plasmique et les potentiateurs augmentent son activité (342,346,352,353). Les stabilisateurs, qui augmentent la demi-vie du CFTR, et les amplificateurs, qui stabilisent l'ARNm du CFTR, sont deux autres catégories de molécules qui ont été développées. Ces deux dernières ne font pas parties du Trikafta/Kaftrio®, mais sont des pistes intéressantes pour améliorer ce traitement.

Il y a une vingtaine d'année, l'espérance de vie d'une personne atteinte de mucoviscidose était de vingt ans. Cette espérance de vie est aujourd'hui d'environ quarante ans grâce au Trikafta/Kaftrio®. De plus, cette thérapie a eu un impact positif conséquent sur la qualité de vie des patients. Ce traitement est cependant loin d'être optimal. En effet, le Trikafta/Kaftrio®, est destiné aux patients possédant au moins un allèle présentant la mutation Phe508del et, dans le cas d'une hétérozygotie, un allèle présentant une mutation produisant un CFTR avec une fonction résiduelle. En prenant en compte ces paramètres, le Trikafta/Kaftrio® est prescriptible à environ 80% des patients. De plus, ces derniers subissent pour la plupart de nombreux effets secondaires, ce qui peut les mener à l'arrêt du traitement. Il est donc toujours nécessaire de trouver de nouvelles solutions thérapeutiques, afin d'apporter un traitement aux patients non éligibles au Trikafta/Kaftrio® et à ceux qui sont forcés d'arrêter le traitement en raison des effets secondaires. C'est dans ce cadre que se situe mon projet de thèse.

Le premier objectif de mon projet de thèse a été d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'inhibition de la voie ATF6. Pour cela, le PF a été utilisé afin d'inhiber spécifiquement la sérine protéase S1P (359), une protéine essentielle dans l'activation de la voie ATF6. Nous avons obtenus nos résultats en utilisant la lignée cellulaire CFBE41o-, des cellules épithéliales bronchiques immortalisées issues d'un patient atteint de la mucoviscidose, et homozygote pour la mutation p.Phe508del-CFTR (374). Nous avons également utilisé des cellules épithéliales bronchiques issues de patients homozygotes pour la même mutation. Le but était de se rapprocher le plus possible *in vitro* des conditions physiopathologiques observées chez les patients.

Avant de s'intéresser plus particulièrement aux effets de l'inhibition de la S1P sur le p.Phe508del-CFTR, nous avons validé que l'utilisation du PF était viable dans notre contexte. Tout d'abord, nous avons montré que le PF n'engendrait pas de toxicité, et qu'il ne déclenchait pas de réponse inflammatoire. Cette dernière étant centrale dans le déclenchement de l'UPR et dans l'évolution de la mucoviscidose, il était vital que notre traitement n'induisse pas son déclenchement.

Nous devons ensuite nous assurer que le PF était bien un inhibiteur spécifique de la S1P. Pour cela, nous avons évalué le clivage de SREBP2, car cette protéine est activée de la même manière

qu'ATF6 (153). SREBP2 est régulièrement utilisée dans la littérature comme marqueur d'activité de la S1P et d'ATF6, car plus facile à détecter que ce dernier. L'absence de clivage de SREBP2, suite au traitement au PF, dans ces expériences souligne la spécificité de cette molécule vis-à-vis de la S1P. De plus, nous avons relevé une baisse d'expression du gène *INSIG1*. Ce gène code pour une protéine inhibant l'activation des SREBPs (375). L'inhibition des SREBPs mène à la diminution de la production de cholestérol et d'acides gras, qui sont des paramètres déclencheurs de l'expression de *INSIG1* (94,158). De plus, une boucle de rétrocontrôle existe entre *INSIG1* et les SREBPs. La baisse d'expression de *INSIG1* illustre donc une baisse d'activité des SREBPs, et apporte une preuve supplémentaire que la S1P est bien inhibée par le PF. Nos expériences d'immunofluorescences, montrant que le PF empêche la relocalisation nucléaire de ATF6 (et donc son activation), viennent appuyer ces résultats. Pour terminer sur la caractérisation des effets globaux du PF sur notre modèle, nous avons montré que cette molécule réduisait l'expression de Grp78, le principal marqueur d'activation de l'UPR (129). De plus, étant donné qu'inhiber ATF6 peut avoir des conséquences sur l'activation des autres voies de l'UPR, nous avons montré que l'expression des gènes *PERK*, *IRE1*, *CHOP* et *XBPI* n'était pas altérée.

Nous nous sommes ensuite intéressé aux effets du PF sur le p.Phe508del-CFTR. Par *patch clamp* sur cellules entières et par expérience de chambre de Ussing, nous avons observé que les efflux d'ions Cl⁻ liés à l'activité du p.Phe508del-CFTR étaient significativement augmentés suite à l'inhibition de la S1P. Dans les expériences de *patch clamp*, nous avons situé l'efficacité du PF en comparant ses effets à ceux du VX-809, un correcteur de première génération. Comme attendu, le VX-809 augmente significativement les efflux d'ions Cl⁻ du p.Phe508del-CFTR, mais dans une moindre mesure que dans le cas du PF. De plus, nous n'avons pas relevé d'effets synergiques entre ces deux molécules. Cependant, cela ne signifie pas que le PF en association avec le Trikafta/Kaftrio® montrera de tels effets. Par contrainte de temps, nous n'avons pu ni comparer les effets, ni évaluer la présence de potentielles synergies entre le PF et le Trikafta/Kaftrio®. Des expériences ultérieures sur ce sujet amèneraient des informations supplémentaires sur le potentiel thérapeutique du PF.

Pour expliquer l'origine de l'augmentation de ces efflux d'ions Cl⁻, nous nous sommes intéressés à l'expression du canal p.Phe508del-CFTR. Une précédente étude de l'équipe avait montré que la production de l'ARNm du p.Phe508del-CFTR était augmentée après traitement au PF (369), mais son expression au niveau protéique n'avait pas été évaluée. Ainsi, grâce à des immunoprécipitations, nous avons montré que l'inhibition de la S1P par le PF permet d'augmenter la synthèse globale de la bande B du CFTR. Ces résultats ont été vérifiés par résonance plasmonique de surface, dans le but de s'assurer que l'augmentation des efflux d'ions Cl⁻ était reliée à l'augmentation d'expression de la bande B du CFTR, et non pas de la bande C.

Dans les expériences d'immunoprécipitations, nous avons utilisé le VX-809 pour avoir un point

de comparaison avec le PF. Contrairement au PF, le VX-809 augmente l'expression globale de la bande C du CFTR mais pas celle de la bande B. Cependant, nous avons observé que l'association du PF et du VX-809 semblait avoir un effet synergique, et augmentait l'expression de la bande B du CFTR. Ce résultat est étonnant, car il donne une information différente de celle obtenue suite à nos expériences de *patch clamp* et de chambre de Ussing. En effet, dans ces expériences, nous n'avons pas observé d'effet synergique entre ces deux molécules. Pour tenter de comprendre d'où venait cette différence, nous avons investigué le taux d'exportation membranaire du p.Phe508del-CFTR.

En étudiant des échantillons enrichis en protéines membranaires, nous avons observé que la bande B du CFTR était bien plus détectée après un traitement au PF. Le VX-809 augmente quant à lui l'expression membranaire de la bande C. Cependant, lorsque le PF et le VX-809 sont associés, la bande B semble moins exprimée. Il est possible que le VX-809 aide à la maturation de la forme semi-glycosylée du CFTR obtenue suite à un traitement au PF. Dans notre cas, la bande B correspond au p.Phe508del-CFTR dont la particularité est d'être moins transporté jusqu'à cette localisation cellulaire, tout en gardant sa fonction de canal ionique. Cela pourrait expliquer pourquoi aucune différence significative n'est observée au niveau des efflux d'ions Cl⁻ dans le cas d'une association du PF avec le VX-809.

A ce stade, le mécanisme moléculaire derrière les effets du PF sur le p.Phe508del-CFTR n'était pas clair. Nous avons donc procédé à l'évaluation de l'expression de quatre-vingt-quatre gènes connus pour être impliqués dans l'UPR. Parmi eux, dix ont été modulés après un traitement au PF. Sept ont montré une surexpression : *HSPA1B*, *CEBPB*, *VIMP*, *PFDN2*, *MAPK8*, *XBP1* et *PPP1R15A*. Et nous avons observé une diminution d'expression pour trois d'entre eux : *CALR/CRT*, *HSPA5* et *INSIG1*.

HSPA5 est le gène codant pour la Grp78. Il fait sens que son expression soit diminuée aux vues de nos résultats précédemment obtenus sur l'expression de Grp78. L'implication de *INSIG1* a été décrite précédemment.

HSPA1B, *PFDN2*, *PPP1R15A*, *CALR* et *CEBPB* peuvent donner des pistes expliquant pourquoi le p.Phe508del-CFTR parvient à s'extraire de l'ERAD.

En effet, *HSPA1B* est une protéine chaperon permettant d'aider au repliement et de transporter les protéines nouvellement synthétisées. Cependant, en fonction de son état d'acétylation, *HSPA1B* permet de garder un équilibre dans le protéome en induisant également la dégradation de protéines mal formées, dont le p.Phe508del-CFTR (376). Il a été montré que *HSPA1B* permet de faciliter le repliement des protéines après qu'un stress cellulaire soit induit (377). Cette protéine peut donc être un acteur important dans l'aide au repliement du p.Phe508del-CFTR. Sa deuxième fonction est également intéressante. En effet, le fait de limiter l'accumulation de protéines par leur dégradation peut participer à maintenir un état d'équilibre recherché dans le cadre d'une réponse UPR surstimulée.

Au même titre que HSPA1B, PFDN2 permet d'aider au bon repliement des protéines. Une étude a déjà montré que sa surexpression permettait d'améliorer le devenir du p.Phe508del-CFTR (378), faisant de cette protéine un facteur sans nul doute impliqué dans notre contexte.

PPP1R15A, ou GADD34, est la protéine au centre de la boucle de rétrocontrôle de la voie PERK. Elle permet de déphosphoryler eIF2 α , et ainsi d'empêcher à la voie PERK d'induire une réduction de la synthèse globale des protéines (146,147). Son action peut donc jouer un rôle important dans notre contexte en empêchant la répression de la transcription du gène *CFTR*.

La sous expression de CALR/CRT est également intéressante. En effet, la CRT est une protéine centrale dans les étapes de contrôle qualité du RE (cf Introduction I.B.2.b). Elle est en partie responsable de la dégradation du p.Phe508del-CFTR lors de son passage à cette étape de vérification. Sa sous expression permettrait donc de limiter la dégradation du canal p.Phe508del-CFTR.

Enfin, CEBPB est un facteur de transcription connu pour réguler des gènes impliqués dans les réponses immunitaire et inflammatoire. De plus, il a été montré que CEBPB pouvait également se fixer sur le promoteur du gène *CFTR* et induire sa transcription (379,380). Cette protéine ne joue pas directement sur le repliement du p.Phe508del-CFTR ou sur sa dégradation, mais cet acteur joue sûrement un rôle essentiel en augmentant l'expression du p.Phe508del-CFTR. Cela s'ajouterait aux effets du PF, qui mène à la levée de la répression transcriptionnelle exercée par ATF6 sur le gène *CFTR*.

La surexpression de VIMP est plus difficile à interpréter. Comme mentionné plus haut dans ce manuscrit (cf Introduction I.B.3), VIMP est une protéine centrale dans l'ERAD. Elle interagit avec Derlin-1 et VCP dans le but de former le pore de rétrotranslocation, par lequel les protéines vont sortir du RE afin d'être dégradées par le protéasome 26S (40–42). Nous n'avons pas réussi à expliquer la raison de sa surexpression dans notre contexte, mais il est possible que VIMP soit utile pour réduire le stress engendré par l'accumulation de protéines mal formées dans le RE.

MAPK8 et *XBPI* peuvent quant à eux apporter des précisions sur le mécanisme menant au transport du p.Phe508del-CFTR jusqu'à la membrane plasmique.

MAPK8 (aussi nommé JNK1) est une sérine/thréonine kinase impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la migration, l'apoptose ou l'autophagie. En plus d'avoir montré des effets stabilisateurs sur l'ARNm du CFTR (381), JNK1 a déjà montré son implication dans le transport non conventionnel du p.Phe508del-CFTR (370). Son activation est régulée par la voie kinase de IRE1 α (115). En effet, IRE1 α déclenche la cascade de signalisation impliquant TRAF2/ASK1/JNK1. Le résultat de cette activation est la surexpression de la Beclin-1 et la phosphorylation de Bcl-2. Une fois phosphorylée, Bcl-2 se dissocie de la Beclin-1, permettant la formation du complexe PI3KC3. Ce dernier est à l'origine de la formation des PI3Ps, un composant majeur de la membrane lipidique des autophagosomes (371,382). La Beclin-1, le complexe PI3KC3 et par extension les autophagosomes ont été

montrés comme ayant un rôle central dans la sécrétion non conventionnelle du p.Phe508del-CFTR (370–372,382).

Le cas de XBP1 est un peu plus complexe. En effet, il est étonnant d'avoir enregistré une surexpression de XBP1 dans les expériences de PCR quantitatives en temps réel, mais pas dans les expériences de RT-PCR. Il est possible que cette différence soit due au fait que les PCR quantitatives en temps réel permettent d'observer des variations d'expressions plus subtiles dans le temps. Cette technique nous aurait donc permis de mettre en évidence cette hausse d'expression.

Nous avons montré que le PF et la thapsigargine permettaient d'augmenter le clivage de XBP1 (XBP1s), synonyme d'une hausse de son activation. La thapsigargine augmentait plus fortement la présence de cette forme que dans le cas du PF. Néanmoins, associer ces deux molécules n'a montré aucun effet additif ou synergique sur le taux de XBP1s. Il semble que le PF régule d'une certaine manière le clivage de XBP1, même après l'induction de l'UPR par la thapsigargine. Cela pourrait signifier que le PF joue un rôle protecteur vis-à-vis d'un stress ultérieur, offrant à la cellule des conditions plus favorables pendant qu'elle cherche à restaurer une homéostasie globale.

La surexpression de XBP1, et surtout l'augmentation de son clivage, est un point important pouvant expliquer l'augmentation de l'expression membranaire du p.Phe508del-CFTR. Tout comme JNK1, son activité est régulée par la voie IRE1 α , mais par son l'activité endoribonucléasique. Il a été montré que XBP1s, en tant que facteur de transcription, promouvait l'expression de la Beclin-1 ainsi que de LC3 (372). Comme dit précédemment, ces deux protéines sont des acteurs centraux dans la formation des autophagosomes. Ces derniers sont aussi des acteurs clés du processus de l'UPS, permettant le transport de protéines transmembranaires mutées jusqu'à la membrane plasmique, y compris le p.Phe508del-CFTR (371,372).

La mise en lumière de MAPK8/JNK1 et XBP1 dans notre contexte nous a directement dirigées vers la deuxième partie de ce projet. Cette dernière consiste à comprendre plus en détail l'implication de l'inhibition de la S1P dans le transport du p.Phe508del-CFTR via l'UPS. Le rôle de l'UPR dans la régulation de l'UPS médiée par l'autophagie n'est pas nouveau, surtout grâce à des études ayant montré l'implication de IRE1 α (248,266,324,370) et PERK (383,384). Cependant, aucune étude n'a, à notre connaissance, relié l'activité de ATF6 dans ce contexte. Hormis une étude qui a souligné l'implication de ATF6 dans la régulation du complexe mTOR (187). Nous avons donc évalué les effets de l'inhibition de la S1P sur l'expression de divers marqueurs connus pour être impliqués dans l'autophagie et ayant également un rôle dans l'UPS. De par l'implication de JNK1 et de XBP1, nous avons choisi de nous focaliser sur IRE1 α , même si la voie PERK semble jouer un rôle important dans ce processus.

La première étape de cette partie consistait à valider qu'IRE1 α était activée suite à l'inhibition de la S1P. Nous avons montré que l'expression protéique de IRE1 α était augmentée. Ce résultat peut paraître étonnant, car nous avons précédemment présenté que la production de l'ARNm de IRE1 α n'était pas significativement augmentée dans les conditions de traitement au PF. Cependant, il peut y avoir une différence entre la production d'un ARNm et la synthèse de la protéine associée. Ainsi, il est possible que nos conditions ne permettent pas d'augmenter la transcription du gène *IRE1*, mais que les ARNm produits soient moins dégradés et plus traduits.

Nous avons ensuite montré que l'état de phosphorylation, et donc l'activation, de IRE1 α était augmenté après l'inhibition de la S1P. En sachant que IRE1 α s'active par oligomérisation et transphosphorylation de ses domaines luminaux, ce résultat est sûrement en lien avec la surexpression de IRE1 α précédemment observée. En effet, dans ce cas, plus de protéines IRE1 α sont produites ce qui augmente les possibilités d'interactions entre elles.

Après avoir mis en évidence que l'inhibition de la S1P augmentait l'expression des marqueurs IRE1 α (phosphorylée ou non), XBP1s et JNK1, nous avons voulu savoir ce qu'il en était concernant l'expression d'acteurs de l'autophagie. Nous avons évalué l'expression de vingt protéines connues pour être impliquées à différents niveaux dans ce mécanisme. L'expression de deux protéines a été significativement augmentée après avoir inhibé la S1P : LC3A et LAMP-1.

LC3A est un des trois homologues des LC3s et possède deux variants (LC3A variants 1 et 2, LC3B et LC3C). Ces protéines possèdent une forte homologie de séquence, mais ne sont pas codées par les mêmes gènes. Il a été observé que la localisation cellulaire d'un homologue à l'autre était différente. LC3B évolue entre le noyau et le cytoplasme en fonction des besoins cellulaires, tandis que LC3C, très mobile, prend la place de LC3B là où cette protéine est manquante. Aucune variation notable n'a été relevée entre les deux variants de LC3A, mais il a été reporté que cette dernière est aussi bien localisée dans le noyau que dans le cytoplasme (236).

Comme mentionné plus haut dans ce manuscrit (cf Introduction III.B.2.c), les LC3 font partie de la famille de protéine ATG8, cette dernière étant centrale dans les étapes d'élongation et de maturation des autophagosomes (237). LC3B est la forme la plus largement étudiée dans la littérature, et aucune différence de fonction entre ces homologues n'a été décrite à ce jour. Cependant, la différence d'expression entre LC3A et LC3B observée dans notre contexte n'est pas un hasard. Il est raisonnable de penser que les différences de localisation entre ces homologues doivent avoir un impact sur leur fonction cellulaire. Des études approfondies à ce sujet pourraient permettre de déterminer si LC3A est spécifique de la formation d'autophagosomes destinés à transporter le p.Phe508del-CFTR jusqu'à la membrane plasmique.

LAMP-1 constitue, avec son homologue LAMP-2, 50% de la membrane des lysosomes (385). Jusqu'ici, c'est une protéine qui a plutôt été utilisée comme marqueur pour évaluer la formation des lysosomes, ou plus généralement le déclenchement de l'autophagie. Cependant, LAMP-1 est impliquée dans la sortie de protéines cargo de l'appareil de Golgi pour atteindre la membrane plasmique (cf Introduction I.C.3.c) (101). Son implication dans ce processus est encore loin d'être totalement expliquée. De plus, nous avons aussi vu que de nombreuses membranes cellulaires, y compris l'appareil de Golgi et la membrane plasmique, peuvent être à l'origine de la formation des autophagosomes (cf Introduction III.B.2.a) (207). Il est donc possible que LAMP-1 joue un rôle dans la formation de ces vésicules.

Ensuite, nous avons voulu vérifier l'expression de la Beclin-1 par western blots, même si notre screening de protéine n'avait pas révélé de variation. Ni le PF ni la thapsigargine n'ont produit d'augmentation d'expression de cette protéine. Ce résultat est surprenant car son implication dans l'autophagie et l'UPS a déjà été prouvée (371,372). De plus, il a été montré que l'activité de XBP1s augmente la transcription du gène codant la Beclin-1 (372). Cependant, il est possible que son ARNm soit plus produit mais que cela ne joue pas sur sa synthèse protéique. Nous pourrions étudier la production d'ARNm de la Beclin-1. Cependant, les effets de la Beclin-1 sont dépendants de son état de phosphorylation. De ce fait, des expériences visant à évaluer cela, après avoir inhibé la S1P, sont en cours de réalisation. Ces résultats préliminaires, qui ne sont pas présentés dans ce manuscrit, semblent montrer une augmentation de la phosphorylation de la Beclin-1 en présence de PF.

Pour finir, nous avons étudié l'expression et l'état de phosphorylation de GRASP55. En effet, cette protéine fait partie des premiers acteurs à avoir été mis en évidence dans le transport du p.Phe508del-CFTR vers la membrane plasmique, médié par l'UPS (266). Comme pour la Beclin-1, ces expériences ne sont pas encore finalisées.

Comme présenté dans la deuxième partie des résultats de ce manuscrit, la thapsigargine réduit aussi bien l'expression globale de GRASP55 que sa phosphorylation, et cela en présence de PF ou non.

Une étude a montré que la thapsigargine ne permettait pas d'augmenter la production d'ARNm de GRASP55 au bout de six heures de traitement, à une concentration proche de celle que nous avons utilisée (0.5 μ M dans nos expériences contre 1 μ M dans cette étude). Ils n'ont pu observer une augmentation de sa synthèse qu'au bout de vingt-quatre heures (373). En parallèle, d'autres études ont montré qu'un traitement d'une heure à la thapsigargine, à la même concentration, suffisait à phosphoryler et à relocaliser GRASP55 en-dehors de l'appareil de Golgi (266,324). Dans notre contexte, une hypothèse pourrait être que GRASP55 est relocalisée jusqu'au RE, se fixe au p.Phe508del-CFTR et l'amène à être transportée jusqu'à la membrane plasmique en empruntant l'UPS. La faible concentration et le temps court de traitement ne nous permettrait pas d'observer une augmentation de son expression. La machinerie cellulaire pourrait ne pas avoir eu le temps de se mettre en place, afin de renouveler la quantité de protéine GRASP55

utilisée pour aider au transport du p.Phe508del-CFTR. Il est cependant difficile de comprendre pourquoi le PF permet d'augmenter le transport membranaire du p.Phe508del-CFTR sans pour autant faire varier l'expression et la phosphorylation de GRASP55. Une hypothèse serait que d'autres acteurs jouent un rôle dans ce contexte, avec ou non un lien direct avec GRASP55.

Le calcium est un messager très présent dans les différents processus cellulaires. Il a été montré qu'une augmentation de calcium cytosolique permettait d'activer l'AMPK, et donc d'inhiber mTOR (386–388). Néanmoins, ces mêmes études ont montré que la thapsigargine n'inhibait que partiellement l'activité de mTOR dans des cellules AMPK^{-/-}. Ces études ont également observé que certaines protéines mutées ne pouvaient pas être transportées par l'UPS après l'inhibition de mTOR avec de la rapamycine. Tout cela suggère que d'autres acteurs parallèles peuvent permettre de procéder à la mise en place de l'UPS.

L'un d'eux pourrait être la Beclin-1, une cible directe de l'AMPK mais dont l'activation dépend également de JNK1. En effet, de hautes concentrations cytosoliques en calcium promeuvent la dissociation de la Beclin-1 de Bcl-2, et mènent donc à la formation du complexe PI3KC3 (389,390).

La thapsigargine affecte directement la quantité cytosolique de calcium et peut donc altérer tous ces processus. Il serait intéressant de tester d'induire l'UPR par d'autres moyens, comme par exemple avec un traitement à la tunicamycine. Cela permettrait de déclencher l'UPR par une accumulation de protéines dans la lumière du RE. Ainsi, cela nous permettrait de nous s'assurer que les mêmes acteurs observés ici sont régulés en dehors d'un déséquilibre dans la distribution du calcium cellulaire.

Conclusion et perspectives

En conclusion, ce projet de thèse a permis de mettre en évidence que l'inhibition d'ATF6, par le blocage de l'activité de la S1P, pouvait être une piste thérapeutique potentielle dans le cadre de la mucoviscidose.

En effet, nous avons montré dans une première partie que l'inhibition de la S1P permettait d'augmenter la synthèse globale et l'exportation membranaire du p.Phe508del-CFTR. Cela s'est traduit par une forte augmentation des efflux d'ions Cl⁻ liés à la hausse d'expression de ce canal. Le PF a également montré un effet protecteur vis-à-vis de la mise en place d'un stress ultérieur.

Dans un second temps, nous avons commencé à apporter des éléments de réponses sur le mécanisme cellulaire menant à l'obtention de ces dits effets.

Nous avons mis en évidence certains gènes régulés par la réponse UPR, dont certains pourraient être des pistes prometteuses permettant de comprendre le mécanisme global. Parmi eux, la surexpression de HSPA1B, PFDN2 et CEBPB, associée à la diminution d'expression de la CRT, pourrait expliquer en partie l'augmentation d'expression et la stabilisation de la protéine p.Phe508del-CFTR. Les surexpressions de JNK1, XBP1, LC3A et LAMP-1 nous ont permis de mettre en évidence que l'inhibition de la S1P permet de transporter le p.Phe508del-CFTR jusqu'à la membrane plasmique en promouvant l'UPS.

D'autres résultats préliminaires ont été obtenus. Nous n'avons pas mis en évidence de surexpression de la Beclin-1 dans notre modèle, mais il semble que cette protéine soit activée en réponse à un traitement au PF. Nous avons également commencé à étudier les effets de l'inhibition de la S1P sur GRASP55. Les résultats obtenus sont inattendus, mais ouvre la voie à de nouvelles investigations. Nous pourrions penser à étudier les effets de la thapsigargine à différents temps et concentration, malgré l'importance du calcium dans la cellule. L'utilisation de la tunicamycine pourrait également être une alternative de choix, afin de ne pas altérer les nombreux mécanismes cellulaires régulés par les ions calcium.

Une autre voie de recherche intéressante serait l'étude de l'impact de la voie PERK sur le transport membranaire du p.Phe508del-CFTR. En effet, comme certaines études l'ont montré, cette voie peut également jouer un rôle important dans la régulation de l'UPS (383,384). Par manque de temps, nous n'avons pas pu évaluer l'activité de la cascade de signalisation TRAF2-ASK1-JNK médiée par IRE1 α . Il serait intéressant d'approfondir cet aspect pour mieux comprendre les effets moléculaires globaux obtenus après l'inhibition de la S1P.

Comment les protéines mutées, solubles ou membranaires, sont-elles choisies pour entrer dans l'UPS plutôt que d'emprunter la voie de dégradation ? Trouver la réponse à cette question permettrait d'apporter beaucoup d'informations sur le fonctionnement de l'UPS.

Une première piste serait d'étudier Rab8A et Rab8B. En effet, il a été montré que Rab8A est un marqueur spécifique des autophagosomes destinés à transporter des protéines mutées, alors que Rab8B est spécifique des autophagosomes menant à leur dégradation (248,326). De nos jours, aucune technique efficace ne permet de suivre en temps réel le trajet de structures lipidiques. En imaginant que cela se développent suffisamment, Rab8A ou Rab8B pourraient être des marqueurs à utiliser pour suivre facilement le devenir des protéines au sein des autophagosomes.

Une deuxième piste serait de se pencher sur les interactions entre les protéines cargo et leur récepteur permettant leur entrée dans ce système. Deux études ont montré que ce genre d'approche pouvait permettre d'apporter des précisions sur le devenir d'une protéine mutée. Elles ont étudié le cas du récepteur *Tripartite motif-containing protein 16* (TRIM16). Ce dernier a montré qu'il pouvait permettre l'entrée de l'Interleukine-1 β dans des autophagosomes en interagissant avec Sec22 (391). De plus, ce récepteur peut interagir avec GABARAP et non pas avec p62. Ce dernier, contrairement à GABARAP, est spécifique de la voie de dégradation liée à l'autophagie (392). Cela voudrait dire que le devenir d'une protéine, vers la voie de la dégradation ou de sécrétion, pourrait être déterminé en fonction du récepteur qui la prend en charge. Ces récepteurs pourraient alors devenir des cibles thérapeutiques de choix. Dans notre contexte, GRASP55 pourrait tenir un rôle dans ce processus. En effet, il présente dans sa séquence le motif LIR, également retrouvé sur LC3 qui constitue les autophagosomes. L'interaction de ces deux protéines semble être un point vital pour le transport du p.Phe508del-CFTR vers la membrane plasmique.

Il est connu depuis longtemps que les autophagosomes peuvent fusionner avec d'autres vésicules telles que les endosomes tardifs et les corps multivésiculaires (amphisomes) ou les lysosomes (autolysosomes/autophagolysosomes) (244,245). Cependant, une interaction avec des vésicules, telles que les COP-II, venant du RE est nécessaire pour faire sortir le p.Phe508del-CFTR de cet organite. En plus de GRASP55, l'implication de Sec16A (324) et l'interaction de TRIM16 avec Sec22 (391) indiquent que la fusion entre les autophagosomes et les vésicules COP-II est envisageable. Néanmoins, des acteurs spécifiquement impliqués dans la constitution des corps multivésiculaires ce sont montrés nécessaire au transport non conventionnel du p.Phe508del-CFTR (248). Cela complexifie notre compréhension de la succession des différentes étapes de fusion entre ces corps lipidiques. En effet, les corps multivésiculaires sont plutôt connus pour être impliqués dans l'endocytose ou la dégradation de protéines, et ne sont pas produit par le RE (248,393). La question en résultant est : à quel moment et pour quelles raisons les autophagosomes fusionnent avec ces corps multivésiculaires ?

Le PF a été un bon outil pour mettre en lumière les différentes conséquences issues de l'inhibition de la S1P. Il n'est cependant peut-être pas la molécule optimale pour obtenir des

effets synergiques avec d'autres traitements déjà existants. Même si nous n'avons pas comparé ses effets avec le Trikafta/Kaftrio®, la combinaison du PF et du VX-809 n'a pas donné de résultats pertinents. Il serait sûrement intéressant d'évaluer l'effet du PF en association avec le Trikafta/Kaftrio®.

Cependant, au sein de l'équipe, quatre molécules analogues ont été trouvées *in silico*, et sont le sujet d'un brevet en cours de réalisation. L'une d'entre elle a été synthétisée, et n'a montré aucune toxicité sur notre modèle cellulaire. Une augmentation des efflux d'ions Cl⁻ liés à l'activité du p.Phe508del-CFTR a également été observée. A terme, il serait intéressant de tester séparément ces différentes molécules dans un premier temps pour s'assurer qu'elles ne soient pas toxiques. Puis de les tester entre elles et avec d'autres traitements existants, ou prometteurs, afin de mettre en lumière une potentielle synergie qui permettrait d'optimiser les traitements apportés aux patients.

Le fait que l'inhibition de la S1P joue sur autant de mécanismes soulève cependant un problème.

En effet, le fait que SREBP2 ne soit pas clivée après un traitement au PF donne une information sur la spécificité du PF vis-à-vis de la S1P. Cependant, il n'est pas à exclure que d'autres acteurs cibles de la S1P soient malgré tout actifs dans notre contexte.

De plus, même si nous avons choisi les modèles cellulaires les plus proches possible des conditions physiopathologiques, les expérimentations *in vitro* ne permettent pas d'apprécier l'effet d'un traitement à la hauteur d'un organisme entier. Des essais de traitement au PF, sur une durée moyenne et à des doses importantes, sur des modèles murins ont déjà été réalisés et n'ont pas montré d'effet toxique sur ces animaux. Néanmoins, il est possible que l'inhibition d'une telle voie engendre des effets secondaires. Il serait intéressant de se rapprocher d'autres modèles animaux plus pertinents pour s'affranchir de ces questions, tels que le furet ou le porc qui sont plus proche physiologiquement de l'humain.

Dans le cas où l'inhibition de la S1P est utilisée comme solution thérapeutique, une fragmentation du traitement pourrait être mise en place si des effets indésirables non abusifs sont observés. En effet, la molécule inhibitrice de S1P pourrait être administrée pendant une courte période pendant les phases d'exacerbations de la maladie, et le traitement pourrait être arrêté avant l'apparition d'effets secondaires.

La commercialisation du Trikafta/Kaftrio® a été une avancée majeure dans le traitement aux patients. Cependant, le développement de nouvelles molécules pour remplacer ce trio pourraient élargir la gamme de classes de mutation pouvant être concernées. L'inhibition de la S1P reste une solution thérapeutique innovante dans ce contexte.

Au vu de nos différents résultats, le PF, et l'inhibition de la S1P de manière générale, semble fournir les mêmes effets qu'un correcteur. Cependant, le mécanisme pour y parvenir est différent. Les correcteurs actuels ciblent directement la protéine CFTR, afin de lui permettre d'acquérir une structure tridimensionnelle viable et de suivre la voie de sécrétion

conventionnelle des protéines. Le PF stimule le transport membranaire du p.Phe508del-CFTR par l'UPS, sans intervenir directement sur cette protéine. En théorie, le PF ou d'autres molécules analogues ne gênent pas la fixation d'autres composés sur le CFTR, permettant aux correcteurs et potentiateurs existant d'être également efficaces.

Nos résultats ont également montré que le PF augmentait la synthèse de l'ARNm du p.Phe508del-CFTR. Bien que les amplificateurs actuels soient définis pour leur capacité à stabiliser l'ARNm et à limiter sa dégradation, l'objectif final reste d'augmenter la quantité d'ARNm globale, ce que nous avons observé après avoir inhiber la S1P.

Donc d'un côté, nous aurions les effets des correcteurs et des potentiateurs augmentant respectivement le transport et l'activité du CFTR. De l'autre côté, nous aurions une inhibition de S1P, qui augmente la synthèse du CFTR et son transport membranaire en promouvant l'UPS. Nous pouvons imaginer que stimuler l'UPS permet d'acheminer du CFTR muté à la membrane plasmique, en plus du CFTR correctement replié grâce à l'intervention des correcteurs.

Ce projet s'est focalisé sur le cas de la mutation p.Phe508del. Il est donc nécessaire de tester les effets de l'inhibition de la S1P sur d'autres classes de mutation, avant de tirer des conclusions définitives sur le potentiel thérapeutique à grande échelle d'une telle approche. Néanmoins, des traitements inhibiteurs de la S1P pourraient théoriquement permettre de cibler plus de classes de mutation.

Parmi les six classes de mutations existantes, la classe I serait la seule pour laquelle cette approche n'aurait aucun effet.

L'UPS déclenchée dans notre contexte répond au besoin des mutations de classe II, qui produisent un CFTR montrant des difficultés à être transporté dans la cellule.

Pour les classes III et V, l'augmentation de synthèse du CFTR qu'apporte l'inhibition de la S1P, associée à des potentiateurs et des amplificateurs (tel que le PTI-428), pourrait donner une synergie intéressante.

Pour la classe IV, l'augmentation de synthèse et du transport de ce type de CFTR serait toujours un plus, mais l'association avec un correcteur permettant de maintenir la structure de ses segments transmembranaires serait nécessaire.

Le CFTR est maintenu et stabilisé à la membrane grâce à l'intervention de différents acteurs protéiques. Evaluer leur expression serait intéressant, afin de savoir si l'inhibition de la S1P permet d'augmenter la stabilité membranaire du CFTR. Cela permettrait de mieux situer les effets de l'inhibition de la S1P sur les mutations de classe VI. Le candidat phare de ce type d'investigation serait le *sodium hydrogen exchange regulatory factor 1 NHERF1* (394).

Il est connu que le métabolisme lipidique est perturbé dans les cellules chez les patients atteints de mucoviscidose. Les SREBPs étant des acteurs centraux dans la régulation de ce métabolisme, inhiber la S1P permet de bloquer l'activation de ces protéines (94,158). La restauration d'un état normal du métabolisme des lipides pourrait aider à l'insertion du CFTR à la membrane plasmique, et répondre aux problématiques posées par les mutations de la classe

VI. Plus généralement l'inhibition des SREBPs permettrait d'apporter des solutions visant à restaurer une régulation dans la synthèse de cholestérol et d'acides gras dans le cadre de la mucoviscidose.

Beaucoup de questions restent encore en suspens concernant le mécanisme moléculaire précis se cachant derrière le transport non conventionnel de la protéine CFTR. Il existe encore de nombreuses pistes à explorer pour décrypter ce processus, et qui peuvent mener à la découverte de cibles thérapeutiques intéressantes.

Un des grands défis d'aujourd'hui est de cibler évidemment le plus de patients possibles. Néanmoins, ceux ayant la chance d'être éligible aux traitements actuels subissent des effets secondaires pouvant être très handicapant au quotidien.

Un autre point qui n'a pas été mentionné jusqu'à maintenant est le prix du traitement. Par exemple, dans les pays d'Europe occidentale médicalisés, la somme prodiguée pour faire gagner une année de vie à un individu varie entre 20.000 et 50.000 € par an. Pour le Kalydeco®, le coût était estimé à \$300.000 par an et par patient. Pour l'Orkambi® et le Symdeko®, il était de \$272.000 et \$292.000 respectivement. Aujourd'hui, le prix du Trikafta/Kaftrio® par patient et par an est estimé à \$326.000. Ces chiffres astronomiques montrent bien un besoin urgent de démocratiser au maximum les traitements existants. Cela passe par une réduction des coûts de fabrication, mais surtout de lever le monopole présent sur la distribution de ces médicaments et ainsi de réduire la marge faite sur leur vente.

Bibliographie

1. Porter KR, Claude A, Fullam EF. A STUDY OF TISSUE CULTURE CELLS BY ELECTRON MICROSCOPY : METHODS AND PRELIMINARY OBSERVATIONS. *J Exp Med.* 1 mars 1945;81(3):233-46.
2. Porter KR, Thompson HP. A particulate body associated with epithelial cells cultured from mammary carcinomas of mice of a milkfactor strain. *J Exp Med.* juill 1948;88(1):15-24.
3. Porter KR, Kallman FL. Significance of cell particulates as seen by electron microscopy. *Ann N Y Acad Sci.* 10 juill 1952;54(6):882-91.
4. Porter KR. Observations on a submicroscopic basophilic component of cytoplasm. *J Exp Med.* mai 1953;97(5):727-50.
5. Shibata Y, Voeltz GK, Rapoport TA. Rough sheets and smooth tubules. *Cell.* 11 août 2006;126(3):435-9.
6. Baumann O, Walz B. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol.* 2001;205:149-214.
7. Caro LG, Palade GE. PROTEIN SYNTHESIS, STORAGE, AND DISCHARGE IN THE PANCREATIC EXOCRINE CELL. AN AUTORADIOGRAPHIC STUDY. *J Cell Biol.* mars 1964;20(3):473-95.
8. Intracellular aspects of the process of protein synthesis - PubMed [Internet]. [cité 3 août 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17812524/>
9. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 15 mai 1999;13(10):1211-33.
10. Rapoport TA, Li L, Park E. Structural and Mechanistic Insights into Protein Translocation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 6 oct 2017;33(1):369-90.
11. High S, Andersen SS, Görlich D, Hartmann E, Prehn S, Rapoport TA, et al. Sec61p is adjacent to nascent type I and type II signal-anchor proteins during their membrane insertion. *J Cell Biol.* mai 1993;121(4):743-50.
12. Mothes W, Heinrich SU, Graf R, Nilsson I, von Heijne G, Brunner J, et al. Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell.* 16 mai 1997;89(4):523-33.
13. Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science.* 20 juill 1973;181(4096):223-30.
14. Dobson CM. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol.* févr 2004;15(1):3-16.

15. Ellis RJ. Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends Biochem Sci.* juill 2006;31(7):395-401.
16. Laskey RA, Honda BM, Mills AD, Finch JT. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature.* 5 oct 1978;275(5679):416-20.
17. Morange M. [Heat shock proteins]. *Ann Pathol.* mai 2000;20(3):188-9.
18. Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* 15 avr 1974;84(3):389-98.
19. Heat shock proteins. *Journal of Biological Chemistry.* 25 juill 1990;265(21):12111-4.
20. Mogk A, Schlieker C, Friedrich KL, Schönfeld HJ, Vierling E, Bukau B. Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J Biol Chem.* 15 août 2003;278(33):31033-42.
21. Mogk A, Deuerling E, Vorderwülbecke S, Vierling E, Bukau B. Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol Microbiol.* oct 2003;50(2):585-95.
22. Schlieker C, Bukau B, Mogk A. Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol.* 13 juin 2002;96(1):13-21.
23. Liberek K, Lewandowska A, Zietkiewicz S. Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J.* 23 janv 2008;27(2):328-35.
24. McCaffrey K, Braakman I. Protein quality control at the endoplasmic reticulum. *Essays Biochem.* 15 oct 2016;60(2):227-35.
25. Sevier CS, Kaiser CA. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* nov 2002;3(11):836-47.
26. Corfield A. Eukaryotic protein glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochem Cell Biol.* févr 2017;147(2):119-47.
27. Ferris SP, Kodali VK, Kaufman RJ. Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. *Dis Model Mech.* mars 2014;7(3):331-41.
28. Molinari M, Galli C, Piccaluga V, Pieren M, Paganetti P. Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER. *J Cell Biol.* 22 juill 2002;158(2):247-57.
29. Zacchi LF, Caramelo JJ, McCracken AA, Brodsky JL. Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and Protein Quality Control. In: Bradshaw RA, Stahl PD, éditeurs. *Encyclopedia of Cell Biology* [Internet]. Waltham: Academic Press; 2016 [cité 10 août 2023]. p. 596-611. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123944474100720>

30. Ninagawa S, Okada T, Sumitomo Y, Kamiya Y, Kato K, Horimoto S, et al. EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step. *J Cell Biol.* 4 août 2014;206(3):347-56.
31. Hosokawa N, Tremblay LO, You Z, Herscovics A, Wada I, Nagata K. Enhancement of endoplasmic reticulum (ER) degradation of misfolded Null Hong Kong alpha1-antitrypsin by human ER mannosidase I. *J Biol Chem.* 11 juill 2003;278(28):26287-94.
32. Roth J, Zuber C. Quality control of glycoprotein folding and ERAD: the role of N-glycan handling, EDEM1 and OS-9. *Histochem Cell Biol.* févr 2017;147(2):269-84.
33. Hosokawa N, Tremblay LO, Sleno B, Kamiya Y, Wada I, Nagata K, et al. EDEM1 accelerates the trimming of alpha1,2-linked mannose on the C branch of N-glycans. *Glycobiology.* mai 2010;20(5):567-75.
34. Hirao K, Natsuka Y, Tamura T, Wada I, Morito D, Natsuka S, et al. EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming. *J Biol Chem.* 7 avr 2006;281(14):9650-8.
35. Hosokawa N, Kamiya Y, Kato K. The role of MRH domain-containing lectins in ERAD. *Glycobiology.* juin 2010;20(6):651-60.
36. Hosokawa N, Kamiya Y, Kamiya D, Kato K, Nagata K. Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans. *J Biol Chem.* 19 juin 2009;284(25):17061-8.
37. Ninagawa S, Okada T, Takeda S, Mori K. SEL1L is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal proteins but not transmembrane proteins in chicken DT40 cell line. *Cell Struct Funct.* 2011;36(2):187-95.
38. Gillece P, Luz JM, Lennarz WJ, de La Cruz FJ, Römisch K. Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J Cell Biol.* 27 déc 1999;147(7):1443-56.
39. Christianson JC, Shaler TA, Tyler RE, Kopito RR. OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol.* mars 2008;10(3):272-82.
40. Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature.* 24 juin 2004;429(6994):841-7.
41. Ye Y, Shibata Y, Kikkert M, van Voorden S, Wiertz E, Rapoport TA. Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 oct 2005;102(40):14132-8.
42. Lilley BN, Ploegh HL. Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 oct 2005;102(40):14296-301.
43. Ye Y, Tang WK, Zhang T, Xia D. A Mighty “Protein Extractor” of the Cell: Structure and Function of the p97/CDC48 ATPase. *Front Mol Biosci.* 13 juin 2017;4:39.

44. Buchberger A, Schindelin H, Hänzelmann P. Control of p97 function by cofactor binding. *FEBS Lett.* 14 sept 2015;589(19 Pt A):2578-89.
45. Yeung HO, Kloppsteck P, Niwa H, Isaacson RL, Matthews S, Zhang X, et al. Insights into adaptor binding to the AAA protein p97. *Biochem Soc Trans.* févr 2008;36(Pt 1):62-7.
46. Hou X, Wei H, Rajagopalan C, Jiang H, Wu Q, Zaman K, et al. Dissection of the Role of VIMP in Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation of CFTR Δ F508. *Sci Rep.* 19 mars 2018;8(1):4764.
47. Borgo C, D'Amore C, Capurro V, Tomati V, Sondo E, Cresta F, et al. Targeting the E1 ubiquitin-activating enzyme (UBA1) improves elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor efficacy towards F508del and rare misfolded CFTR mutants. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(4):192.
48. Estabrooks SK, Brodsky JL. Ubiquitination of Disease-Causing CFTR Variants in a Microsome-Based Assay. *Anal Biochem.* 1 sept 2020;604:113829.
49. Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator - PubMed [Internet]. [cité 10 août 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16901789/>
50. Yang H, Zhong X, Ballar P, Luo S, Shen Y, Rubinsztein DC, et al. Ubiquitin ligase Hrd1 enhances the degradation and suppresses the toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin. *Exp Cell Res.* 1 févr 2007;313(3):538-50.
51. Hosokawa N, Wada I. Association of the SEL1L protein transmembrane domain with HRD1 ubiquitin ligase regulates ERAD-L. *FEBS J.* janv 2016;283(1):157-72.
52. Xu C, Ng DTW. Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol.* déc 2015;16(12):742-52.
53. Novick P, Field C, Schekman R. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell.* 1 août 1980;21(1):205-15.
54. Deshaies RJ, Schekman R. A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* août 1987;105(2):633-45.
55. Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, et al. COPII: A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell.* 17 juin 1994;77(6):895-907.
56. Barlowe C, Schekman R. SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature.* sept 1993;365(6444):347-9.
57. Matsuoka K, Orci L, Amherdt M, Bednarek SY, Hamamoto S, Schekman R, et al. COPII-Coated Vesicle Formation Reconstituted with Purified Coat Proteins and Chemically Defined Liposomes. *Cell.* 17 avr 1998;93(2):263-75.
58. Lee MCS, Orci L, Hamamoto S, Futai E, Ravazzola M, Schekman R. Sar1p N-Terminal Helix Initiates Membrane Curvature and Completes the Fission of a COPII Vesicle. *Cell.* 26 août 2005;122(4):605-17.

59. Bi X, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Sec23/24–Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature*. sept 2002;419(6904):271-7.
60. Stagg SM, Gürkan C, Fowler DM, LaPointe P, Foss TR, Potter CS, et al. Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature*. janv 2006;439(7073):234-8.
61. Miller EA, Beilharz TH, Malkus PN, Lee MCS, Hamamoto S, Orci L, et al. Multiple Cargo Binding Sites on the COPII Subunit Sec24p Ensure Capture of Diverse Membrane Proteins into Transport Vesicles. *Cell*. 22 août 2003;114(4):497-509.
62. Kung LF, Pagant S, Futai E, D’Arcangelo JG, Buchanan R, Dittmar JC, et al. Sec24p and Sec16p cooperate to regulate the GTP cycle of the COPII coat. *EMBO J*. 15 févr 2012;31(4):1014-27.
63. Yorimitsu T, Sato K. Sec16 and Sed4 interdependently function as interaction and localization partners at ER exit sites. *J Cell Sci*. 9 mai 2023;136(9):jcs261094.
64. Weigel AV, Chang CL, Shtengel G, Xu CS, Hoffman DP, Freeman M, et al. ER-to-Golgi protein delivery through an interwoven, tubular network extending from ER. *Cell*. 29 avr 2021;184(9):2412-2429.e16.
65. McCaughey J, Stevenson NL, Cross S, Stephens DJ. ER-to-Golgi trafficking of procollagen in the absence of large carriers. *Journal of Cell Biology*. 26 déc 2018;218(3):929-48.
66. Raote I, Malhotra V. Protein transport by vesicles and tunnels. *J Cell Biol*. 4 mars 2019;218(3):737-9.
67. Allan BB, Moyer BD, Balch WE. Rab1 Recruitment of p115 into a cis-SNARE Complex: Programming Budding COPII Vesicles for Fusion. *Science*. 21 juill 2000;289(5478):444-8.
68. Sacher M, Barrowman J, Wang W, Horecka J, Zhang Y, Pypaert M, et al. TRAPP I Implicated in the Specificity of Tethering in ER-to-Golgi Transport. *Molecular Cell*. 1 févr 2001;7(2):433-42.
69. Cai Y, Chin HF, Lazarova D, Menon S, Fu C, Cai H, et al. The Structural Basis for Activation of the Rab Ypt1p by the TRAPP Membrane-Tethering Complexes. *Cell*. 27 juin 2008;133(7):1202-13.
70. Role of Vesicle-Associated Syntaxin 5 in the Assembly of Pre-Golgi Intermediates | *Science* [Internet]. [cité 11 août 2023]. Disponible sur: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.279.5351.696>
71. Xu D, Joglekar AP, Williams AL, Hay JC. Subunit Structure of a Mammalian ER/Golgi SNARE Complex*. *Journal of Biological Chemistry*. 15 déc 2000;275(50):39631-9.
72. Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. mars 1993;362(6418):318-24.

73. Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, et al. SNAREpins: Minimal Machinery for Membrane Fusion. *Cell*. 20 mars 1998;92(6):759-72.
74. Parlati F, McNew JA, Fukuda R, Miller R, Söllner TH, Rothman JE. Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature*. sept 2000;407(6801):194-8.
75. Malhotra V, Serafini T, Orci L, Shepherd JC, Rothman JE. Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell*. 28 juill 1989;58(2):329-36.
76. Serafini T, Stenbeck G, Brecht A, Lottspeich F, Orel L, Rothman JE, et al. A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein β -adaptin. *Nature*. janv 1991;349(6306):215-20.
77. Waters MG, Serafini T, Rothman JE. « Coatomer »: a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature*. janv 1991;349(6306):248-51.
78. Day KJ, Staehelin LA, Glick BS. A Three-Stage Model of Golgi Structure and Function. *Histochem Cell Biol*. sept 2013;140(3):239-49.
79. Xiang Y, Wang Y. GRASP55 and GRASP65 play complementary and essential roles in Golgi cisternal stacking. *J Cell Biol*. 25 janv 2010;188(2):237-51.
80. Emr S, Glick BS, Linstedt AD, Lippincott-Schwartz J, Luini A, Malhotra V, et al. Journeys through the Golgi—taking stock in a new era. *J Cell Biol*. 16 nov 2009;187(4):449-53.
81. Nakano A, Luini A. Passage through the Golgi. *Curr Opin Cell Biol*. août 2010;22(4):471-8.
82. Glick BS, Luini A. Models for Golgi Traffic: A Critical Assessment. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. nov 2011;3(11):a005215.
83. Papanikou E, Glick BS. Golgi Compartmentation and Identity. *Curr Opin Cell Biol*. août 2014;0:74-81.
84. Schjoldager KT, Narimatsu Y, Joshi HJ, Clausen H. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. déc 2020;21(12):729-49.
85. Yang X, Yu W, Shi L, Sun L, Liang J, Yi X, et al. HAT4, a Golgi Apparatus-Anchored B-Type Histone Acetyltransferase, Acetylates Free Histone H4 and Facilitates Chromatin Assembly. *Molecular Cell*. 7 oct 2011;44(1):39-50.
86. Damme PV, Hole K, Pimenta-Marques A, Helsens K, Vandekerckhove J, Martinho RG, et al. NatF Contributes to an Evolutionary Shift in Protein N-Terminal Acetylation and Is Important for Normal Chromosome Segregation. *PLOS Genetics*. 7 juill 2011;7(7):e1002169.
87. Kehoe JW, Bertozzi CR. Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions. *Chem Biol*. mars 2000;7(3):R57-61.

88. Honke K, Taniguchi N. Sulfotransferases and sulfated oligosaccharides. *Medicinal Research Reviews*. 2002;22(6):637-54.
89. Yang YS, Wang CC, Chen BH, Hou YH, Hung KS, Mao YC. Tyrosine Sulfation as a Protein Post-Translational Modification. *Molecules*. févr 2015;20(2):2138-64.
90. Hunter T. Protein modification: phosphorylation on tyrosine residues. *Curr Opin Cell Biol*. déc 1989;1(6):1168-81.
91. Organellar Proteomics Reveals Golgi Arginine Dimethylation | *Molecular Biology of the Cell* [Internet]. [cité 14 déc 2023]. Disponible sur: <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e04-02-0101>
92. Salaun C, Greaves J, Chamberlain LH. The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J Cell Biol*. 27 déc 2010;191(7):1229-38.
93. Hughey RP, Mueller GM, Bruns JB, Kinlough CL, Poland PA, Harkleroad KL, et al. Maturation of the epithelial Na⁺ channel involves proteolytic processing of the alpha- and gamma-subunits. *J Biol Chem*. 26 sept 2003;278(39):37073-82.
94. Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. 1 nov 2004;86(11):839-48.
95. Munro S, Pelham HR. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*. 13 mars 1987;48(5):899-907.
96. Tu L, Banfield DK. Localization of Golgi-resident glycosyltransferases. *Cell Mol Life Sci*. janv 2010;67(1):29-41.
97. Kornfeld S, Mellman I. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol*. 1989;5:483-525.
98. Lefrancois S, Zeng J, Hassan AJ, Canuel M, Morales CR. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J*. 15 déc 2003;22(24):6430-7.
99. Ni X, Morales CR. The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic*. juill 2006;7(7):889-902.
100. Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, et al. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell*. 16 nov 2007;131(4):770-83.
101. Stalder D, Gershlick DC. Direct trafficking pathways from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *Semin Cell Dev Biol*. nov 2020;107:112-25.
102. Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*. 31 mars 1988;332(6163):462-4.
103. Ribeiro CMP, Boucher RC. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Cystic Fibrosis–Related Airway Inflammatory Responses. *Proc Am Thorac Soc*. 1 nov 2010;7(6):387-94.

104. Trouvé P, Férec C, Génin E. The Interplay between the Unfolded Protein Response, Inflammation and Infection in Cystic Fibrosis. *Cells*. nov 2021;10(11):2980.
105. Kerbiriou M, Le Drévo MA, Férec C, Trouvé P. Coupling cystic fibrosis to endoplasmic reticulum stress: Differential role of Grp78 and ATF6. *Biochim Biophys Acta*. déc 2007;1772(11-12):1236-49.
106. Jiang H, Zou J, Zhang H, Fu W, Zeng T, Huang H, et al. Unfolded protein response inducers tunicamycin and dithiothreitol promote myeloma cell differentiation mediated by XBP-1. *Clin Exp Med*. 1 févr 2015;15(1):85-96.
107. Kim EK, Kim Y, Yang JY, Jang HH. Prx1 Regulates Thapsigargin-Mediated UPR Activation and Apoptosis. *Genes*. nov 2022;13(11):2033.
108. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:739-89.
109. Liu CY, Kaufman RJ. The unfolded protein response. *J Cell Sci*. 15 mai 2003;116(Pt 10):1861-2.
110. Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the Unfolded Protein Response from the Endoplasmic Reticulum*. *Journal of Biological Chemistry*. 18 juin 2004;279(25):25935-8.
111. Foufelle F, Ferré P. [Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]. *Med Sci (Paris)*. mars 2007;23(3):291-6.
112. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 25 nov 2011;334(6059):1081-6.
113. Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem*. 12 avr 2002;277(15):13045-52.
114. Hai TW, Liu F, Coukos WJ, Green MR. Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev*. déc 1989;3(12B):2083-90.
115. Ali MMU, Bagratuni T, Davenport EL, Nowak PR, Silva-Santisteban MC, Hardcastle A, et al. Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response. *EMBO J*. 2 mars 2011;30(5):894-905.
116. McQuiston A, Diehl JA. Recent insights into PERK-dependent signaling from the stressed endoplasmic reticulum. *F1000Res*. 2017;6:1897.
117. Munro S, Pelham HR. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell*. 18 juill 1986;46(2):291-300.
118. Wisniewska M, Karlberg T, Lehtiö L, Johansson I, Kotenyova T, Moche M, et al. Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78. *PLoS One*. 11 janv 2010;5(1):e8625.

119. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci.* mars 2005;62(6):670-84.
120. Yang J, Nune M, Zong Y, Zhou L, Liu Q. Close and Allosteric Opening of the Polypeptide-Binding Site in a Human Hsp70 Chaperone BiP. *Structure.* 1 déc 2015;23(12):2191-203.
121. Jin Y, Awad W, Petrova K, Hendershot LM. Regulated release of ERdj3 from unfolded proteins by BiP. *EMBO J.* 5 nov 2008;27(21):2873-82.
122. Lai CW, Otero JH, Hendershot LM, Snapp E. ERdj4 protein is a soluble endoplasmic reticulum (ER) DnaJ family protein that interacts with ER-associated degradation machinery. *J Biol Chem.* 9 mars 2012;287(11):7969-78.
123. Melnyk A, Rieger H, Zimmermann R. Co-chaperones of the mammalian endoplasmic reticulum. *Subcell Biochem.* 2015;78:179-200.
124. Preissler S, Rato C, Chen R, Antrobus R, Ding S, Fearnley IM, et al. AMPylation matches BiP activity to client protein load in the endoplasmic reticulum. *eLife.* 4:e12621.
125. Schäuble N, Lang S, Jung M, Cappel S, Schorr S, Ulucan Ö, et al. BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *EMBO J.* 1 août 2012;31(15):3282-96.
126. Lièvremon JP, Rizzuto R, Hendershot L, Meldolesi J. BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *J Biol Chem.* 5 déc 1997;272(49):30873-9.
127. Gopal U, Pizzo SV. Chapter 2 - The Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78 Also Functions as a Cell Surface Signaling Receptor. In: Pizzo SV, éditeur. *Cell Surface GRP78, a New Paradigm in Signal Transduction Biology* [Internet]. Academic Press; 2018 [cité 28 août 2023]. p. 9-40. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128123515000027>
128. Gopal U, Pizzo SV. Cell surface GRP78 signaling: An emerging role as a transcriptional modulator in cancer. *J Cell Physiol.* avr 2021;236(4):2352-63.
129. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* juin 2000;2(6):326-32.
130. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell.* juill 2002;3(1):99-111.
131. Zhu G, Lee AS. Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis. *J Cell Physiol.* juill 2015;230(7):1413-20.
132. Cox JS, Shamu CE, Walter P. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell.* 18 juin 1993;73(6):1197-206.

133. Mori K, Ma W, Gething MJ, Sambrook J. A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell*. 27 août 1993;74(4):743-56.
134. Karagöz GE, Acosta-Alvear D, Walter P. The Unfolded Protein Response: Detecting and Responding to Fluctuations in the Protein-Folding Capacity of the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. sept 2019;11(9):a033886.
135. Martino M, Jones L, Brighton B, Ehre C, Abdulah L, Davis C, et al. The ER stress transducer IRE1 β is required for airway epithelial mucin production. *Mucosal Immunol*. mai 2013;6(3):639-54.
136. Zhou Z, Wang Q, Michalak M. Inositol Requiring Enzyme (IRE), a multiplayer in sensing endoplasmic reticulum stress. *Anim Cells Syst (Seoul)*. 25(6):347-57.
137. Li H, Korennykh AV, Behrman SL, Walter P. Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 sept 2010;107(37):16113-8.
138. Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, et al. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell*. 6 juill 2007;27(1):53-66.
139. Hollien J, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol*. 10 août 2009;186(3):323-31.
140. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, et al. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*. 1 juin 2002;16(11):1345-55.
141. Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D. Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2002;18:575-99.
142. Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV. THE MECHANISM OF EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION AND PRINCIPLES OF ITS REGULATION. *Nat Rev Mol Cell Biol*. févr 2010;11(2):113-27.
143. Vattam KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 3 août 2004;101(31):11269-74.
144. Read A, Schröder M. The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology (Basel)*. 29 avr 2021;10(5):384.
145. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response - PubMed [Internet]. [cité 13 déc 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12083523/>
146. Lee YY, Cevallos RC, Jan E. An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2 α phosphorylation. *J Biol Chem*. 13 mars 2009;284(11):6661-73.

147. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* avr 2004;11(4):381-9.
148. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell.* nov 1999;10(11):3787-99.
149. Thuerauf DJ, Marcinko M, Belmont PJ, Glembotski CC. Effects of the Isoform-specific Characteristics of ATF6 α and ATF6 β on Endoplasmic Reticulum Stress Response Gene Expression and Cell Viability*. *Journal of Biological Chemistry.* 3 août 2007;282(31):22865-78.
150. Shen J, Snapp EL, Lippincott-Schwartz J, Prywes R. Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cell Biol.* févr 2005;25(3):921-32.
151. Sato Y, Nadanaka S, Okada T, Okawa K, Mori K. Luminal domain of ATF6 alone is sufficient for sensing endoplasmic reticulum stress and subsequent transport to the Golgi apparatus. *Cell Struct Funct.* 2011;36(1):35-47.
152. Higa A, Taouji S, Lhomond S, Jensen D, Fernandez-Zapico ME, Simpson JC, et al. Endoplasmic reticulum stress-activated transcription factor ATF6 α requires the disulfide isomerase PDIA5 to modulate chemoresistance. *Mol Cell Biol.* mai 2014;34(10):1839-49.
153. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, et al. ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. *Molecular Cell.* 1 déc 2000;6(6):1355-64.
154. Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL. Regulated Intramembrane Proteolysis: A Control Mechanism Conserved from Bacteria to Humans. *Cell.* 18 févr 2000;100(4):391-8.
155. Bommasamy H, Back SH, Fagone P, Lee K, Meshinchi S, Vink E, et al. ATF6 α induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 15 mai 2009;122(10):1626-36.
156. Okada T, Haze K, Nadanaka S, Yoshida H, Seidah NG, Hirano Y, et al. A Serine Protease Inhibitor Prevents Endoplasmic Reticulum Stress-induced Cleavage but Not Transport of the Membrane-bound Transcription Factor ATF6*. *Journal of Biological Chemistry.* 15 août 2003;278(33):31024-32.
157. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell.* 2 mai 1997;89(3):331-40.
158. Ernst WL, Shome K, Wu CC, Gong X, Frizzell RA, Aridor M. VAMP-associated Proteins (VAP) as Receptors That Couple Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Proteostasis with Lipid Homeostasis. *J Biol Chem.* 4 mars 2016;291(10):5206-20.
159. Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, et al. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol.* mai 2013;15(5):481-90.

160. Yamaguchi H, Wang HG. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem.* 29 oct 2004;279(44):45495-502.
161. Sandow JJ, Dorstyn L, O'Reilly LA, Tailler M, Kumar S, Strasser A, et al. ER stress does not cause upregulation and activation of caspase-2 to initiate apoptosis. *Cell Death Differ.* mars 2014;21(3):475-80.
162. Pihán P, Carreras-Sureda A, Hetz C. BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death Differ.* sept 2017;24(9):1478-87.
163. Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell.* juin 2001;7(6):1165-76.
164. Delépine M, Nicolino M, Barrett T, Golamaully M, Lathrop GM, Julier C. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet.* août 2000;25(4):406-9.
165. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, et al. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest.* 15 févr 2002;109(4):525-32.
166. Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ. Chop deletion reduces oxidative stress, improves β cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest.* 1 oct 2008;118(10):3378-89.
167. Lee AH, Heidtman K, Hotamisligil GS, Glimcher LH. Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1 α and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24 mai 2011;108(21):8885-90.
168. Allagnat F, Christulia F, Ortis F, Pirot P, Lortz S, Lenzen S, et al. Sustained production of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) induces pancreatic beta cell dysfunction and apoptosis. *Diabetologia.* juin 2010;53(6):1120-30.
169. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 15 oct 2004;306(5695):457-61.
170. Azzout-Marniche D, Bécard D, Guichard C, Foretz M, Ferré P, Fougelle F. Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem J.* 1 sept 2000;350(Pt 2):389-93.
171. Ferré P, Phan F, Fougelle F. SREBP-1c and lipogenesis in the liver: an update1. *Biochem J.* 29 oct 2021;478(20):3723-39.
172. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol.* 25 juin 2012;197(7):857-67.
173. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanism, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* août 2020;21(8):421-38.

174. Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, et al. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress–induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest.* 1 mai 2009;119(5):1201-15.
175. Park SW, Zhou Y, Lee J, Lu A, Sun C, Chung J, et al. The regulatory subunits of PI3K, p85 α and p85 β , interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation. *Nat Med.* avr 2010;16(4):429-37.
176. Zhou Y, Lee J, Reno CM, Sun C, Park SW, Chung J, et al. REGULATION OF GLUCOSE HOMEOSTASIS THROUGH XBP1-FOXO1 INTERACTION. *Nat Med.* mars 2011;17(3):356-65.
177. Wang Y, Vera L, Fischer WH, Montminy M. The CREB Coactivator CRTC2 Links Hepatic ER Stress and Fasting Gluconeogenesis. *Nature.* 23 juill 2009;460(7254):534-7.
178. Zhang K, Wong HN, Song B, Miller CN, Scheuner D, Kaufman RJ. The unfolded protein response sensor IRE1 α is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *J Clin Invest.* 1 févr 2005;115(2):268-81.
179. Iwakoshi NN, Pypaert M, Glimcher LH. The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J Exp Med.* 1 oct 2007;204(10):2267-75.
180. Tufanli O, Telkoparan Akillilar P, Acosta-Alvear D, Kocaturk B, Onat UI, Hamid SM, et al. Targeting IRE1 with small molecules counteracts progression of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 févr 2017;114(8):E1395-404.
181. Jin JK, Blackwood EA, Azizi K, Thuerauf DJ, Fahem AG, Hofmann C, et al. ATF6 Decreases Myocardial Ischemia/Reperfusion Damage and Links ER Stress and Oxidative Stress Signaling Pathways in the Heart. *Circ Res.* 3 mars 2017;120(5):862-75.
182. Duan Q, Ni L, Wang P, Chen C, Yang L, Ma B, et al. Deregulation of XBP1 expression contributes to myocardial vascular endothelial growth factor-A expression and angiogenesis during cardiac hypertrophy in vivo. *Aging Cell.* août 2016;15(4):625-33.
183. Chen X, Iliopoulos D, Zhang Q, Tang Q, Greenblatt MB, Hatziapostolou M, et al. XBP1 Promotes Triple Negative Breast Cancer By Controlling the HIF1 α Pathway. *Nature.* 3 avr 2014;508(7494):103-7.
184. Vandewynckel YP, Laukens D, Geerts A, Bogaerts E, Paridaens A, Verhelst X, et al. The paradox of the unfolded protein response in cancer. *Anticancer Res.* nov 2013;33(11):4683-94.
185. Bobrovnikova-Marjon E, Grigoriadou C, Pytel D, Zhang F, Ye J, Koumenis C, et al. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene.* 8 juill 2010;29(27):3881-95.
186. The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance - Madden - 2019 - *Biology of the Cell* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 18 sept 2023]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/boc.201800050#oc201800050-bib-0023>

187. ATF6 α -Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo - PMC [Internet]. [cité 15 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2492459/>
188. Moenner M, Pluquet O, Bouchecareilh M, Chevet E. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res.* 15 nov 2007;67(22):10631-4.
189. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications - PubMed [Internet]. [cité 15 sept 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17440054/>
190. Cornejo VH, Hetz C. The unfolded protein response in Alzheimer's disease. *Semin Immunopathol.* mai 2013;35(3):277-92.
191. Meier S, Bell M, Lyons DN, Ingram A, Chen J, Gensel JC, et al. Identification of Novel Tau Interactions with Endoplasmic Reticulum Proteins in Alzheimer's Disease Brain. *J Alzheimers Dis.* 2015;48(3):687-702.
192. Yoon SO, Park DJ, Ryu JC, Ozer HG, Tep C, Shin YJ, et al. JNK3 perpetuates metabolic stress induced by Abeta peptides. *Neuron.* 6 sept 2012;75(5):824-37.
193. Suppression of eIF2 α kinases alleviates AD-related synaptic plasticity and spatial memory deficits - PMC [Internet]. [cité 19 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3756900/>
194. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models - PubMed [Internet]. [cité 19 sept 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16794039/>
195. Valdés P, Mercado G, Vidal RL, Molina C, Parsons G, Court FA, et al. Control of dopaminergic neuron survival by the unfolded protein response transcription factor XBP1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6 mai 2014;111(18):6804-9.
196. Colla E, Coune P, Liu Y, Pletnikova O, Troncoso JC, Iwatsubo T, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Is Important for the Manifestations of α -Synucleinopathy In Vivo. *J Neurosci.* 7 mars 2012;32(10):3306-20.
197. Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, et al. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev.* 1 juin 2008;22(11):1451-64.
198. Hetz C, Saxena S. ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nat Rev Neurol.* août 2017;13(8):477-91.
199. Gkogkas C, Middleton S, Kremer AM, Wardrope C, Hannah M, Gillingwater TH, et al. VAPB interacts with and modulates the activity of ATF6. *Hum Mol Genet.* 1 juin 2008;17(11):1517-26.
200. XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy - PubMed [Internet]. [cité 19 sept 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19762508/>

201. Yang H, Liu C, Zhong Y, Luo S, Monteiro MJ, Fang S. Huntingtin Interacts with the Cue Domain of gp78 and Inhibits gp78 Binding to Ubiquitin and p97/VCP. *PLoS One*. 26 janv 2010;5(1):e8905.
202. Huntingtin proteolysis releases non-polyQ fragments that cause toxicity through dynamin 1 dysregulation - PMC [Internet]. [cité 19 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4585462/>
203. PRIME PubMed | Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy [Internet]. [cité 19 sept 2023]. Disponible sur: https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/22337954/Targeting_the_UPR_transcription_factor_XBP1_protects_against_Huntington's_disease_through_the_regulation_of_FoxO1_and_autophagy_
204. Deter RL, de Duve C. INFLUENCE OF GLUCAGON, AN INDUCER OF CELLULAR AUTOPHAGY, ON SOME PHYSICAL PROPERTIES OF RAT LIVER LYSOSOMES. *J Cell Biol*. 1 mai 1967;33(2):437-49.
205. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res*. janv 2014;24(1):9-23.
206. Johansen T, Lamark T. Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *J Mol Biol*. 3 janv 2020;432(1):80-103.
207. Zhen Y, Stenmark H. Autophagosome Biogenesis. *Cells*. 20 févr 2023;12(4):668.
208. Farré JC, Subramani S. Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process. *Trends Cell Biol*. sept 2004;14(9):515-23.
209. Kissová I, Salin B, Schaeffer J, Bhatia S, Manon S, Camougrand N. Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy*. 2007;3(4):329-36.
210. Krick R, Mühe Y, Prick T, Bredschneider M, Bremer S, Wenzel D, et al. Piecemeal microautophagy of the nucleus: genetic and morphological traits. *Autophagy*. févr 2009;5(2):270-2.
211. Schuck S, Gallagher CM, Walter P. ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery. *J Cell Sci*. 15 sept 2014;127(Pt 18):4078-88.
212. Vevea JD, Garcia EJ, Chan RB, Zhou B, Schultz M, Di Paolo G, et al. Role for Lipid Droplet Biogenesis and Microlipophagy in Adaptation to Lipid Imbalance in Yeast. *Dev Cell*. 7 déc 2015;35(5):584-99.
213. Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy*. mai 2008;4(4):510-2.
214. Eickhorst C, Licheva M, Kraft C. Scaffold proteins in bulk and selective autophagy. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2020;172:15-35.
215. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. févr 2011;13(2):132-41.

216. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* oct 2007;9(10):1102-9.
217. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature.* 21 mars 2013;495(7441):389-93.
218. de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature.* 4 déc 2008;456(7222):605-10.
219. Kumar S, Javed R, Mudd M, Pallikkuth S, Lidke KA, Jain A, et al. Mammalian hybrid pre-autophagosomal structure HyPAS generates autophagosomes. *Cell.* 24 nov 2021;184(24):5950-5969.e22.
220. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 25 août 2008;182(4):685-701.
221. Matoba K, Kotani T, Tsutsumi A, Tsuji T, Mori T, Noshiro D, et al. Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion. *Nat Struct Mol Biol.* déc 2020;27(12):1185-93.
222. Valverde DP, Yu S, Boggavarapu V, Kumar N, Lees JA, Walz T, et al. ATG2 transports lipids to promote autophagosome biogenesis. *J Cell Biol.* 28 juin 2019;218(6):1787-98.
223. Judith D, Jefferies HBJ, Boeing S, Frith D, Snijders AP, Tooze SA. ATG9A shapes the forming autophagosome through Arfaptin 2 and phosphatidylinositol 4-kinase III β . *J Cell Biol.* 6 mai 2019;218(5):1634-52.
224. Ghanbarpour A, Valverde DP, Melia TJ, Reinisch KM. A model for a partnership of lipid transfer proteins and scramblases in membrane expansion and organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20 avr 2021;118(16):e2101562118.
225. van Vliet AR, Chiduzza GN, Maslen SL, Pye VE, Joshi D, De Tito S, et al. ATG9A and ATG2A form a heteromeric complex essential for autophagosome formation. *Mol Cell.* 17 nov 2022;82(22):4324-4339.e8.
226. Melia TJ, Reinisch KM. A possible role for VPS13-family proteins in bulk lipid transfer, membrane expansion and organelle biogenesis. *J Cell Sci.* 10 mars 2022;135(5):jcs259357.
227. Jean S, Kiger AA. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J Cell Sci.* 1 mars 2014;127(5):923-8.
228. Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell.* déc 2008;19(12):5360-72.
229. Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, Akira S, Ktistakis NT, Izumi T, et al. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol.* 23 août 2010;190(4):511-21.

230. Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, et al. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating Vps34 lipid kinase. *Nat Cell Biol.* juill 2013;15(7):741-50.
231. Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W, et al. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell.* 17 janv 2013;152(1-2):290-303.
232. Karanasios E, Stapleton E, Manifava M, Kaizuka T, Mizushima N, Walker SA, et al. Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J Cell Sci.* 15 nov 2013;126(Pt 22):5224-38.
233. Dooley HC, Razi M, Polson HEJ, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12–5-16L1. *Mol Cell.* 17 juill 2014;55(2):238-52.
234. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* 2 juin 2010;29(11):1792-802.
235. Koukourakis MI, Kalamida D, Giatromanolaki A, Zois CE, Sivridis E, Pouliliou S, et al. Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. *PLOS ONE.* 17 sept 2015;10(9):e0137675.
236. Baeken MW, Weckmann K, Diefenthaler P, Schulte J, Yusifli K, Moosmann B, et al. Novel Insights into the Cellular Localization and Regulation of the Autophagosomal Proteins LC3A, LC3B and LC3C. *Cells* [Internet]. oct 2020 [cité 6 oct 2023];9(10). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7603224/>
237. Membrane association of the ATG8 conjugation machinery emerges as a key regulatory feature for autophagosome biogenesis - Tooze - *FEBS Letters* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 28 déc 2023]. Disponible sur: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14676>
238. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy. *Mol Biol Cell.* mai 2008;19(5):2092-100.
239. Jiang W, Chen X, Ji C, Zhang W, Song J, Li J, et al. Key Regulators of Autophagosome Closure. *Cells.* 20 oct 2021;10(11):2814.
240. Hu YX, Han XS, Jing Q. Ca²⁺ Ion and Autophagy. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1206:151-66.
241. Decuyper JP, Bultynck G, Parys JB. A dual role for Ca²⁺ in autophagy regulation. *Cell Calcium.* sept 2011;50(3):242-50.
242. Vietri M, Radulovic M, Stenmark H. The many functions of ESCRTs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* janv 2020;21(1):25-42.

243. Zhou F, Wu Z, Zhao M, Segev N, Liang Y. Autophagosome closure by ESCRT: Vps21/RAB5-regulated ESCRT recruitment via an Atg17-Snf7 interaction. *Autophagy*. 15 juin 2019;15(9):1653-4.
244. Lőrincz P, Juhász G. Autophagosome-Lysosome Fusion. *Journal of Molecular Biology*. 3 avr 2020;432(8):2462-82.
245. Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerød L, Fisher EMC, et al. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *Journal of Cell Biology*. 5 nov 2007;179(3):485-500.
246. Zhang X, Wang L, Lak B, Li J, Jokitalo E, Wang Y. GRASP55 senses glucose deprivation through O-GlcNAcylation to promote autophagosome-lysosome fusion. *Dev Cell*. 23 avr 2018;45(2):245-261.e6.
247. Mauvezin C, Nagy P, Juhász G, Neufeld TP. Autophagosome-lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification. *Nat Commun*. 11 mai 2015;6(1):7007.
248. Noh SH, Gee HY, Kim Y, Piao H, Kim J, Kang CM, et al. Specific autophagy and ESCRT components participate in the unconventional secretion of CFTR. *Autophagy*. 2018;14(10):1761-78.
249. Scotet V, Gutierrez H, Farrell PM. Newborn Screening for CF across the Globe—Where Is It Worthwhile? *Int J Neonatal Screen*. 4 mars 2020;6(1):18.
250. Férec C, Scotet V. Genetics of cystic fibrosis: Basics. *Arch Pediatr*. févr 2020;27 Suppl 1:eS4-7.
251. Wiuf C. Do delta F508 heterozygotes have a selective advantage? *Genet Res*. août 2001;78(1):41-7.
252. Quinton PM. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev*. janv 1999;79(1 Suppl):S3-22.
253. Di Sant'agnese P, Darling RC, Perara GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *AMA Am J Dis Child*. nov 1953;86(5):618-9; discussion, 619.
254. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*. mars 1959;23(3):545-9.
255. Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*. 3 févr 1983;301(5899):421-2.
256. Knowles M, Gatzky J, Boucher R. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 17 déc 1981;305(25):1489-95.
257. Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, et al. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science*. 29 nov 1985;230(4729):1054-7.

258. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, et al. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*. mai 1991;10(1):214-28.
259. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 8 sept 1989;245(4922):1066-73.
260. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science*. 1989;245(4922):1073-80.
261. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. 8 sept 1989;245(4922):1059-65.
262. Wilkens S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep*. 2015;7:14.
263. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, et al. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*. 16 nov 1990;63(4):827-34.
264. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, et al. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*. 16 nov 1990;63(4):827-34.
265. Bezprozvanny I, Maximov A. PDZ domains: More than just a glue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 janv 2001;98(3):787-9.
266. Gee HY, Noh SH, Tang BL, Kim KH, Lee MG. Rescue of $\Delta F508$ -CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. *Cell*. 2 sept 2011;146(5):746-60.
267. Serohijos AWR, Hegedus T, Aleksandrov AA, He L, Cui L, Dokholyan NV, et al. Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 mars 2008;105(9):3256-61.
268. Mornon JP, Hoffmann B, Jonic S, Lehn P, Callebaut I. Full-open and closed CFTR channels, with lateral tunnels from the cytoplasm and an alternative position of the F508 region, as revealed by molecular dynamics. *Cell Mol Life Sci*. avr 2015;72(7):1377-403.
269. Zhou Z, Wang X, Liu HY, Zou X, Li M, Hwang TC. The Two ATP Binding Sites of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Play Distinct Roles in Gating Kinetics and Energetics. *J Gen Physiol*. oct 2006;128(4):413-22.
270. Hwang TC, Kirk KL. The CFTR ion channel: gating, regulation, and anion permeation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1 janv 2013;3(1):a009498.
271. Ward CL, Kopito RR. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem*. 14 oct 1994;269(41):25710-8.

272. Pranke IM, Sermet-Gaudelus I. Biosynthesis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1 juill 2014;52:26-38.
273. Lu Y, Xiong X, Helm A, Kimani K, Bragin A, Skach WR. Co- and posttranslational translocation mechanisms direct cystic fibrosis transmembrane conductance regulator N terminus transmembrane assembly. *J Biol Chem*. 2 janv 1998;273(1):568-76.
274. Kim SJ, Skach WR. Mechanisms of CFTR Folding at the Endoplasmic Reticulum. *Front Pharmacol*. 2012;3:201.
275. O’Riordan CR, Lachapelle AL, Marshall J, Higgins EA, Cheng SH. Characterization of the oligosaccharide structures associated with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Glycobiology*. nov 2000;10(11):1225-33.
276. Association of Domains within the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator | *Biochemistry* [Internet]. [cité 12 déc 2023]. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi962174s>
277. Okiyoneda T, Harada K, Takeya M, Yamahira K, Wada I, Shuto T, et al. Δ F508 CFTR Pool in the Endoplasmic Reticulum Is Increased by Calnexin Overexpression. *Mol Biol Cell*. févr 2004;15(2):563-74.
278. Pind S, Riordan JR, Williams DB. Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*. 29 avr 1994;269(17):12784-8.
279. Assembly and Misassembly of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator: Folding Defects Caused by Deletion of F508 Occur Before and After the Calnexin-dependent Association of Membrane Spanning Domain (MSD) 1 and MSD2 | *Molecular Biology of the Cell* [Internet]. [cité 12 déc 2023]. Disponible sur: <https://www.molbiolcell.org/doi/full/10.1091/mbc.e08-04-0357>
280. Farinha CM, Amaral MD. Most F508del-CFTR is targeted to degradation at an early folding checkpoint and independently of calnexin. *Mol Cell Biol*. juin 2005;25(12):5242-52.
281. Wang X, Venable J, LaPointe P, Hutt DM, Koulov AV, Coppinger J, et al. Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell*. 17 nov 2006;127(4):803-15.
282. Farinha CM, Canato S. From the endoplasmic reticulum to the plasma membrane: mechanisms of CFTR folding and trafficking. *Cell Mol Life Sci*. janv 2017;74(1):39-55.
283. Varga K, Jurkuvenaite A, Wakefield J, Hong JS, Guimbellot JS, Venglarik CJ, et al. Efficient Intracellular Processing of the Endogenous Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Epithelial Cell Lines*. *Journal of Biological Chemistry*. 21 mai 2004;279(21):22578-84.
284. Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL, Riordan JR. Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell*. 6 oct 1995;83(1):129-35.

285. Ward CL, Omura S, Kopito RR. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*. 6 oct 1995;83(1):121-7.
286. Murata S, Chiba T, Tanaka K. CHIP: a quality-control E3 ligase collaborating with molecular chaperones. *Int J Biochem Cell Biol*. mai 2003;35(5):572-8.
287. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science*. 12 juill 1991;253(5016):202-5.
288. Gray MA, Plant S, Argent BE. cAMP-regulated whole cell chloride currents in pancreatic duct cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. mars 1993;264(3):C591-602.
289. Quinton PM. Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *Lancet*. 2 août 2008;372(9636):415-7.
290. Berdiev BK, Qadri YJ, Benos DJ. Assessment of the CFTR and ENaC association. *Mol Biosyst*. févr 2009;5(2):123-7.
291. Sala-Rabanal M, Yurtsever Z, Berry KN, Brett TJ. Novel Roles for Chloride Channels, Exchangers, and Regulators in Chronic Inflammatory Airway Diseases. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:497387.
292. Functional interaction of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with members of the SLC26 family of anion transporters (SLC26A8 and SLC26A9): physiological and pathophysiological relevance - PubMed [Internet]. [cité 14 nov 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24530837/>
293. Mitri C, Sharma H, Corvol H, Tabary O. TMEM16A/ANO1: Current Strategies and Novel Drug Approaches for Cystic Fibrosis. *Cells*. 24 oct 2021;10(11):2867.
294. Benedetto R, Ousingsawat J, Wanitchakool P, Zhang Y, Holtzman MJ, Amaral M, et al. Epithelial Chloride Transport by CFTR Requires TMEM16A. *Sci Rep*. 29 sept 2017;7(1):12397.
295. Nilius B, Droogmans G. Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand*. févr 2003;177(2):119-47.
296. Du K, Sharma M, Lukacs GL. The DeltaF508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR. *Nat Struct Mol Biol*. janv 2005;12(1):17-25.
297. Kartner N, Augustinas O, Jensen TJ, Naismith AL, Riordan JR. Mislocalization of Δ F508 CFTR in cystic fibrosis sweat gland. *Nat Genet*. août 1992;1(5):321-7.
298. Lukacs G I., Mohamed A, Kartner N, Chang X b., Riordan J r., Grinstein S. Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *The EMBO Journal*. 1 déc 1994;13(24):6076-86.
299. Amaral MD. CFTR and chaperones: processing and degradation. *J Mol Neurosci*. 2004;23(1-2):41-8.

300. Sharma M, Pampinella F, Nemes C, Benharouga M, So J, Du K, et al. Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J Cell Biol.* 15 mars 2004;164(6):923-33.
301. Denning GM, Ostedgaard LS, Welsh MJ. Abnormal localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelia. *J Cell Biol.* 1 août 1992;118(3):551-9.
302. Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature.* août 1992;358(6389):761-4.
303. He L, Aleksandrov AA, Serohijos AWR, Hegedüs T, Aleksandrov LA, Cui L, et al. Multiple Membrane-Cytoplasmic Domain Contacts in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Mediate Regulation of Channel Gating. *J Biol Chem.* 26 sept 2008;283(39):26383-90.
304. Scott-Ward TS, Amaral MD. Deletion of Phe508 in the first nucleotide-binding domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator increases its affinity for the heat shock cognate 70 chaperone. *FEBS J.* déc 2009;276(23):7097-109.
305. Norez C, Noel S, Wilke M, Bijvelds M, Jorna H, Melin P, et al. Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett.* 3 avr 2006;580(8):2081-6.
306. van 't Wout EFA, van Schadewijk A, van Boxtel R, Dalton LE, Clarke HJ, Tommassen J, et al. Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* Induce Both the Unfolded Protein and Integrated Stress Responses in Airway Epithelial Cells. *PLoS Pathog.* 17 juin 2015;11(6):e1004946.
307. Mitri C, Xu Z, Bardin P, Corvol H, Touqui L, Tabary O. Novel Anti-Inflammatory Approaches for Cystic Fibrosis Lung Disease: Identification of Molecular Targets and Design of Innovative Therapies. *Front Pharmacol.* 23 juill 2020;11:1096.
308. Nanua S, Sajjan U, Keshavjee S, Hershenson MB. Absence of typical unfolded protein response in primary cultured cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 28 avr 2006;343(1):135-43.
309. Hybiske K, Fu Z, Schwarzer C, Tseng J, Do J, Huang N, et al. Effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and DeltaF508CFTR on inflammatory response, ER stress, and Ca²⁺ of airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* nov 2007;293(5):L1250-1260.
310. Rab A, Bartoszewski R, Jurkuvenaite A, Wakefield J, Collawn JF, Bebok Z. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response regulate genomic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression. *Am J Physiol Cell Physiol.* févr 2007;292(2):C756-766.
311. Nickel W, Seedorf M. Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2008;24:287-308.

312. Nickel W, Rabouille C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* févr 2009;10(2):148-55.
313. Rabouille C, Malhotra V, Nickel W. Diversity in unconventional protein secretion. *J Cell Sci.* 15 nov 2012;125(Pt 22):5251-5.
314. Giuliani F, Grieve A, Rabouille C. Unconventional secretion: a stress on GRASP. *Curr Opin Cell Biol.* août 2011;23(4):498-504.
315. Rabouille C. Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends Cell Biol.* mars 2017;27(3):230-40.
316. Rennolds J, Boyaka PN, Bellis SL, Cormet-Boyaka E. Low temperature induces the delivery of mature and immature CFTR to the plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 22 févr 2008;366(4):1025-9.
317. Luo Y, McDonald K, Hanrahan JW. Trafficking of immature Δ F508-CFTR to the plasma membrane and its detection by biotinylation. *Biochemical Journal.* 13 mars 2009;419(1):211-21.
318. Froux L, Coraux C, Sage E, Becq F. Short-term consequences of F508del-CFTR thermal instability on CFTR-dependent transepithelial currents in human airway epithelial cells. *Sci Rep.* 24 sept 2019;9:13729.
319. Bruns C, McCaffery JM, Curwin AJ, Duran JM, Malhotra V. Biogenesis of a novel compartment for autophagosome-mediated unconventional protein secretion. *J Cell Biol.* 12 déc 2011;195(6):979-92.
320. Zhang M, Kenny SJ, Ge L, Xu K, Schekman R. Translocation of interleukin-1 β into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion. *Elife.* 2 nov 2015;4:e11205.
321. Schotman H, Karhinen L, Rabouille C. dGRASP-Mediated Noncanonical Integrin Secretion Is Required for Drosophila Epithelial Remodeling. *Developmental Cell.* 12 févr 2008;14(2):171-82.
322. Kinseth MA, Anjard C, Fuller D, Guizzunti G, Loomis WF, Malhotra V. The Golgi-Associated Protein GRASP Is Required for Unconventional Protein Secretion during Development. *Cell.* 10 août 2007;130(3):524-34.
323. Farhan H, Weiss M, Tani K, Kaufman RJ, Hauri HP. Adaptation of endoplasmic reticulum exit sites to acute and chronic increases in cargo load. *EMBO J.* 6 août 2008;27(15):2043-54.
324. Piao H, Kim J, Noh SH, Kweon HS, Kim JY, Lee MG. Sec16A is critical for both conventional and unconventional secretion of CFTR. *Sci Rep.* 9 janv 2017;7:39887.
325. Teo H, Gill DJ, Sun J, Perisic O, Veprintsev DB, Vallis Y, et al. ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell.* 7 avr 2006;125(1):99-111.

326. Nüchel J, Ghatak S, Zuk AV, Illerhaus A, Mörgelin M, Schönborn K, et al. TGFB1 is secreted through an unconventional pathway dependent on the autophagic machinery and cytoskeletal regulators. *Autophagy*. 11 mars 2018;14(3):465-86.
327. Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol*. 2016;7:275.
328. Dickinson KM, Collaco JM. Cystic Fibrosis. *Pediatr Rev*. févr 2021;42(2):55-67.
329. Flume PA. Pulmonary complications of cystic fibrosis. *Respir Care*. mai 2009;54(5):618-27.
330. Ratjen F, Bell SC, Rowe SM, Goss CH, Quittner AL, Bush A. Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Primers*. 14 mai 2015;1:15010.
331. Nick JA, Nichols DP. Diagnosis of Adult Patients with Cystic Fibrosis. *Clin Chest Med*. mars 2016;37(1):47-57.
332. Gibson-Corley KN, Meyerholz DK, Engelhardt JF. Pancreatic pathophysiology in cystic fibrosis. *J Pathol*. janv 2016;238(2):311-20.
333. Leeuwen L, Fitzgerald DA, Gaskin KJ. Liver disease in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. mars 2014;15(1):69-74.
334. Ahmad A, Ahmed A, Patrizio P. Cystic fibrosis and fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*. juin 2013;25(3):167-72.
335. Balfour-Lynn IM, Lees B, Hall P, Phillips G, Khan M, Flather M, et al. Multicenter randomized controlled trial of withdrawal of inhaled corticosteroids in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 juin 2006;173(12):1356-62.
336. Jacquot J, Tabary O, Le Rouzic P, Clement A. Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1 janv 2008;40(9):1703-15.
337. Southern KW, Barker PM, Solis-Moya A, Patel L. Macrolide antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 7 déc 2011;(12):CD002203.
338. Saint-Criq V, Ruffin M, Rebeyrol C, Guillot L, Jacquot J, Clement A, et al. Azithromycin fails to reduce inflammation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *European Journal of Pharmacology*. 5 janv 2012;674(1):1-6.
339. Borowitz DS, Grand RJ, Durie PR. Use of pancreatic enzyme supplements for patients with cystic fibrosis in the context of fibrosing colonopathy. Consensus Committee. *J Pediatr*. nov 1995;127(5):681-4.
340. Ramos KJ, Smith PJ, McKone EF, Pilewski JM, Lucy A, Hempstead SE, et al. Lung Transplant Referral for Individuals with Cystic Fibrosis: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Guidelines. *J Cyst Fibros*. mai 2019;18(3):321-33.

341. Okiyoneda T, Veit G, Dekkers JF, Bagdany M, Soya N, Xu H, et al. Mechanism-based corrector combination restores $\Delta F508$ -CFTR folding and function. *Nat Chem Biol.* juill 2013;9(7):10.1038/nchembio.1253.
342. Clancy J, Rowe SM, Accurso FJ, Aitken ML, Amin RS, Ashlock MA, et al. Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax.* janv 2012;67(1):12-8.
343. Fiedorczuk K, Chen J. Mechanism of CFTR correction by type I folding correctors. *Cell.* 6 janv 2022;185(1):158-168.e11.
344. Veit G, Vaccarin C, Lukacs GL. Elexacaftor co-potentiates the activity of F508del and gating mutants of CFTR. *J Cyst Fibros.* sept 2021;20(5):895-8.
345. Bw R, J D, Ng M, E T, Sc B, P D, et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *The New England journal of medicine* [Internet]. 11 mars 2011 [cité 18 déc 2023];365(18). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22047557/>
346. Veit G, Avramescu RG, Perdomo D, Phuan PW, Bagdany M, Apaja PM, et al. Some gating potentiators, including VX-770, diminish $\Delta F508$ -CFTR functional expression. *Sci Transl Med.* 23 juill 2014;6(246):246ra97.
347. Becq F, Mirval S, Carrez T, Lévêque M, Billet A, Coraux C, et al. The rescue of F508del-CFTR by elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (Trikafta) in human airway epithelial cells is underestimated due to the presence of ivacaftor. *Eur Respir J.* févr 2022;59(2):2100671.
348. Donaldson SH, Solomon GM, Zeitlin PL, Flume PA, Casey A, McCoy K, et al. Pharmacokinetics and safety of cavosonstat (N91115) in healthy and cystic fibrosis adults homozygous for F508DEL-CFTR. *J Cyst Fibros.* mai 2017;16(3):371-9.
349. Dukovski D, Vilella A, Bastos C, King R, Finley D, Kelly JW, et al. Amplifiers co-translationally enhance CFTR biosynthesis via PCBP1-mediated regulation of CFTR mRNA. *J Cyst Fibros.* sept 2020;19(5):733-41.
350. Taylor-Cousar JL, Munck A, McKone EF, van der Ent CK, Moeller A, Simard C, et al. Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N Engl J Med.* 23 nov 2017;377(21):2013-23.
351. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, et al. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med.* 16 juill 2015;373(3):220-31.
352. Keating D, Marigowda G, Burr L, Daines C, Mall MA, McKone EF, et al. VX-445-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N Engl J Med.* 25 oct 2018;379(17):1612-20.
353. Davies JC, Moskowitz SM, Brown C, Horsley A, Mall MA, McKone EF, et al. VX-659-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N Engl J Med.* 25 oct 2018;379(17):1599-611.

354. Bengtson C, Silswal N, Baumlin N, Yoshida M, Dennis J, Yerrathota S, et al. The CFTR Amplifier Nesolicaftor Rescues TGF- β 1 Inhibition of Modulator-Corrected F508del CFTR Function. *Int J Mol Sci.* 19 sept 2022;23(18):10956.
355. Bardin P, Sonnevile F, Corvol H, Tabary O. Emerging microRNA Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol.* 8 oct 2018;9:1113.
356. Viart V, Bergougnoux A, Bonini J, Varilh J, Chiron R, Tabary O, et al. Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis. *Eur Respir J.* janv 2015;45(1):116-28.
357. Sonnevile F, Ruffin M, Coraux C, Rousselet N, Le Rouzic P, Blouquit-Laye S, et al. MicroRNA-9 downregulates the ANO1 chloride channel and contributes to cystic fibrosis lung pathology. *Nat Commun.* 27 sept 2017;8:710.
358. Mauger P, Gall TLE, Montier T. Vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes: application à la thérapie génique de la mucoviscidose. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine.* juin 2015;199(6):1001-14.
359. Hay BA, Abrams B, Zumbunn AY, Valentine JJ, Warren LC, Petras SF, et al. Aminopyrrolidineamide inhibitors of site-1 protease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 15 août 2007;17(16):4411-4.
360. Hawkins JL, Robbins MD, Warren LC, Xia D, Petras SF, Valentine JJ, et al. Pharmacologic inhibition of site 1 protease activity inhibits sterol regulatory element-binding protein processing and reduces lipogenic enzyme gene expression and lipid synthesis in cultured cells and experimental animals. *J Pharmacol Exp Ther.* sept 2008;326(3):801-8.
361. Urata S, Yun N, Pasquato A, Paessler S, Kunz S, de la Torre JC. Antiviral activity of a small-molecule inhibitor of arenavirus glycoprotein processing by the cellular site 1 protease. *J Virol.* janv 2011;85(2):795-803.
362. Uchida L, Urata S, Ulanday GEL, Takamatsu Y, Yasuda J, Morita K, et al. Suppressive Effects of the Site 1 Protease (S1P) Inhibitor, PF-429242, on Dengue Virus Propagation. *Viruses.* 10 févr 2016;8(2):46.
363. Hyrina A, Meng F, McArthur SJ, Eivemark S, Nabi IR, Jean F. Human Subtilisin Kexin Isozyme-1 (SKI-1)/Site-1 Protease (S1P) regulates cytoplasmic lipid droplet abundance: A potential target for indirect-acting anti-dengue virus agents. *PLoS One.* 2017;12(3):e0174483.
364. Siqingaowa null, Sekar S, Gopalakrishnan V, Taghibiglou C. Sterol regulatory element-binding protein 1 inhibitors decrease pancreatic cancer cell viability and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 17 juin 2017;488(1):136-40.
365. Wang TB, Geng M, Jin H, Tang AG, Sun H, Zhou LZ, et al. SREBP1 site 1 protease inhibitor PF-429242 suppresses renal cell carcinoma cell growth. *Cell Death Dis.* 20 juill 2021;12(8):717.

366. Lin JC, Liu TP, Chen YB, Yang PM. PF-429242 exhibits anticancer activity in hepatocellular carcinoma cells via FOXO1-dependent autophagic cell death and IGFBP1-dependent anti-survival signaling. *Am J Cancer Res.* 2023;13(9):4125-44.
367. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell.* 28 avr 2000;101(3):249-58.
368. Blohmke CJ, Mayer ML, Tang AC, Hirschfeld AF, Fjell CD, Sze MA, et al. Atypical activation of the unfolded protein response in cystic fibrosis airway cells contributes to p38 MAPK-mediated innate immune responses. *J Immunol.* 1 déc 2012;189(11):5467-75.
369. Huguet F, Guellec J, Kerbiriou M, Gandy M, Thomas J, Férec C, et al. Evaluation of aminopyrrolidine amide to improve chloride transport in CFTR-defective cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 15 sept 2022;72:128866.
370. Park H, Shin DH, Sim JR, Aum S, Lee MG. IRE1 α kinase-mediated unconventional protein secretion rescues misfolded CFTR and pendrin. *Sci Adv.* févr 2020;6(8):eaax9914.
371. Bhardwaj M, Leli NM, Koumenis C, Amaravadi RK. Regulation of autophagy by canonical and non-canonical ER stress responses. *Semin Cancer Biol.* nov 2020;66:116-28.
372. Margariti A, Li H, Chen T, Martin D, Vizcay-Barrena G, Alam S, et al. XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation. *J Biol Chem.* 11 janv 2013;288(2):859-72.
373. van Ziel AM, Largo-Barrientos P, Wolzak K, Verhage M, Scheper W. Unconventional secretion factor GRASP55 is increased by pharmacological unfolded protein response inducers in neurons. *Sci Rep.* 7 févr 2019;9:1567.
374. Gruenert DC, Basbaum CB, Welsh MJ, Li M, Finkbeiner WE, Nadel JA. Characterization of human tracheal epithelial cells transformed by an origin-defective simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci U S A.* août 1988;85(16):5951-5.
375. Bridges JP, Schehr A, Wang Y, Huo L, Besnard V, Ikegami M, et al. Epithelial SCAP/INSIG/SREBP signaling regulates multiple biological processes during perinatal lung maturation. *PLoS One.* 2014;9(5):e91376.
376. Chiaw PK, Hantouche C, Wong MJH, Matthes E, Robert R, Hanrahan JW, et al. Hsp70 and DNAJA2 limit CFTR levels through degradation. *PLOS ONE.* 13 août 2019;14(8):e0220984.
377. Seo JH, Park JH, Lee EJ, Vo TTL, Choi H, Kim JY, et al. ARD1-mediated Hsp70 acetylation balances stress-induced protein refolding and degradation. *Nat Commun.* 6 oct 2016;7:12882.
378. Collawn JF, Fu L, Bebok Z. Targets for cystic fibrosis therapy: proteomic analysis and correction of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Expert Rev Proteomics.* août 2010;7(4):495-506.

379. Pittman N, Shue G, LeLeiko NS, Walsh MJ. Transcription of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator requires a CCAAT-like element for both basal and cAMP-mediated regulation. *J Biol Chem.* 1 déc 1995;270(48):28848-57.
380. Looping of upstream cis-regulatory elements is required for CFTR expression in human airway epithelial cells - PubMed [Internet]. [cité 27 déc 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32095812/>
381. Baudouin-Legros M, Hinzpeter A, Jaulmes A, Brouillard F, Costes B, Fanen P, et al. Cell-specific posttranscriptional regulation of CFTR gene expression via influence of MAPK cascades on 3'UTR part of transcripts. *Am J Physiol Cell Physiol.* nov 2005;289(5):C1240-1250.
382. Xu HD, Qin ZH. Beclin 1, Bcl-2 and Autophagy. In: Qin ZH, éditeur. *Autophagy: Biology and Diseases: Basic Science* [Internet]. Singapore: Springer; 2019 [cité 19 juin 2023]. p. 109-26. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_5
383. B'chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, et al. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* sept 2013;41(16):7683-99.
384. Luhr M, Torgersen ML, Szalai P, Hashim A, Brech A, Staerk J, et al. The kinase PERK and the transcription factor ATF4 play distinct and essential roles in autophagy resulting from tunicamycin-induced ER stress. *J Biol Chem.* 17 mai 2019;294(20):8197-217.
385. Eskelinen EL. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular Aspects of Medicine.* 1 oct 2006;27(5):495-502.
386. Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, et al. Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase- β , and Bcl-2. *Molecular Cell.* janv 2007;25(2):193-205.
387. Vingtdoux V, Giliberto L, Zhao H, Chandakkar P, Wu Q, Simon JE, et al. AMP-activated Protein Kinase Signaling Activation by Resveratrol Modulates Amyloid- β Peptide Metabolism *. *Journal of Biological Chemistry.* 19 mars 2010;285(12):9100-13.
388. Law BYK, Wang M, Ma DL, Al-Mousa F, Michelangeli F, Cheng SH, et al. Alisol B, a Novel Inhibitor of the Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase Pump, Induces Autophagy, Endoplasmic Reticulum Stress, and Apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics.* 9 mars 2010;9(3):718-30.
389. Vergne I, Chua J, Deretic V. Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca²⁺/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. *Journal of Experimental Medicine.* 2003;198(4):653-9.
390. Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, et al. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Reports.* 2009;10(3):285-92.

391. Kimura T, Jia J, Kumar S, Choi SW, Gu Y, Mudd M, et al. Dedicated SNAREs and specialized TRIM cargo receptors mediate secretory autophagy. *EMBO J.* 4 janv 2017;36(1):42-60.
392. Mandell MA, Jain A, Arko-Mensah J, Chauhan S, Kimura T, Dinkins C, et al. TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Dev Cell.* 25 août 2014;30(4):394-409.
393. Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B, Emr SD. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell.* août 2002;3(2):283-9.
394. Kwon SH, Pollard H, Guggino WB. Knockdown of NHERF1 enhances degradation of temperature rescued DeltaF508 CFTR from the cell surface of human airway cells. *Cell Physiol Biochem.* 2007;20(6):763-72.

Annexes

Articles scientifiques :

Raphaël Santinelli, Nathalie Benz, Julie Guellec, Fabien Quinquis, Ervin Kocas, Johan Thomas, Tristan Montier, Chandran Ka, Emilie Luczka-Majérus, Edouard Sage, Christelle Coraux, Pascal Trouvé. *The inhibition of the Membrane-bound transcription factor site-1 protease (MBTP1) alleviates the p.Phe508del-CFTR defects in Cystic Fibrosis cells*. Soumis à Cells, en étape de révision par des paires.

Un article court sous le format d'une « letter » est en cours de réalisation. Le sujet porte sur l'effet de l'inhibition de la S1P dans le transport non conventionnel du p.Phe508del-CFTR médié par l'autophagie. Auteurs : Raphaël Santinelli, Nathalie Benz, Pascal Trouvé. Soumission envisagée dans le journal FEBS letter.

Participations à des congrès :

Raphaël Santinelli, Nathalie Benz, Julie Guellec, Fabien Quinquis, Ervin Kocas, Johan Thomas, Tristan Montier, Chandran Ka, Emilie Luczka-Majérus, Edouard Sage, Christelle Coraux, Pascal Trouvé. *Restauration du transport du p.Phe508del-CFTR par le PF-429242*. Présentation orale. Colloque français des jeunes chercheurs 2023, Vaincre la mucoviscidose. (Institut Imagine, Paris, France, 7 février 2023)

Raphaël Santinelli, Nathalie Benz, Julie Guellec, Fabien Quinquis, Ervin Kocas, Johan Thomas, Tristan Montier, Chandran Ka, Emilie Luczka-Majérus, Edouard Sage, Christelle Coraux, Pascal Trouvé. *PF-429242 alleviates the p.Phe508del-CFTR defects in Cystic Fibrosis cells*. Poster. 18th ECFS basic science conference. (Dubrovnik, Croatia, 29 March – 01 April 2023)

Raphaël Santinelli, Nathalie Benz, Julie Guellec, Fabien Quinquis, Ervin Kocas, Johan Thomas, Tristan Montier, Chandran Ka, Emilie Luczka-Majérus, Edouard Sage, Christelle Coraux, Pascal Trouvé. *PF-429242 alleviates the p.Phe508del-CFTR defects in Cystic Fibrosis cells*. Présentation orale. Journée scientifique de l'école doctorale Science de la Vie et de la Santé. (Guerlédan, France, 04 Septembre – 05 Septembre 2023)

Heures d'enseignements :

Pendant mon doctorat, j'ai eu la possibilité de dispenser 96 heures de cours. Ces cours étaient des travaux pratiques de microbiologie donner à des étudiants de deuxième année de licence.

Titre : Inhibition de la voie ATF6 de la réponse aux protéines mal formées comme nouvelle approche thérapeutique dans le cadre de la mucoviscidose.

Mots clés : Mucoviscidose, p.Phe508del-CFTR, UPR, ATF6, S1P, UPS

La mucoviscidose est la maladie génétique létale à transmission autosomale récessive la plus fréquemment retrouvée dans la population européenne. Elle est due à des mutations altérant le gène CFTR, dont la plus fréquente est la mutation induisant la délétion d'une phénylalanine en position 508 de la séquence polypeptidique de cette protéine (p.Phe508del-CFTR). Ces mutations altèrent la viscosité du mucus présent à la surface apicale des cellules épithéliales des systèmes respiratoire, digestif et génital. Cela entraîne une baisse de la clairance mucociliaire, rendant difficile le renouvellement de ce mucus qui est la première barrière protectrice vis-à-vis du développement de microorganismes potentiellement pathogènes. En conséquence, des réponses inflammatoire et infectieuse se mettent en place. En ajoutant l'accumulation de protéines

mal repliées dans la lumière du RE, le mécanisme de défense adaptatif UPR est déclenché. ATF6 fait partie de ses trois voies régulatrices. Il a été montré que ATF6 inhibait l'expression du CFTR. Le but de ce projet de thèse est d'évaluer les effets de l'inhibition de la S1P, une protéine centrale pour l'activation de ATF6, sur le p.Phe508del-CFTR par des moyens pharmacologiques. Les résultats montrent que les efflux d'ions Cl⁻ lié à l'activité du canal p.Phe508del-CFTR était augmenté grâce à une augmentation de l'expression globale, ainsi que du transport de ce canal jusqu'à la membrane plasmique. Nous donnons également quelques pistes pouvant expliquer ces effets bénéfiques, notamment en rapport avec le déclenchement de l'UPS qui est une voie permettant le transport de protéines mutées jusqu'à la membrane plasmique.

Title: Inhibition of the ATF6 pathway of the unfolded protein response as a new therapeutic approach in cystic fibrosis.

Keywords : Cystic fibrosis, CFTR, p.Phe508del-CFTR, UPR, ATF6, UPS

Cystic fibrosis is the most common lethal autosomal recessive genetic disease in the European population. It is caused by mutations in the CFTR gene, the most common of which is the deletion of a phenylalanine at position 508 of the protein's polypeptide sequence (p.Phe508del-CFTR). These mutations alter the viscosity of the mucus present on the apical surface of epithelial cells in the respiratory, digestive and genital systems. This leads to a reduction in mucociliary clearance, making it difficult to renew the mucus that forms the first protective barrier against the development of potentially pathogenic microorganisms. As a result, inflammatory and infectious responses are triggered. By adding the accumulation of misfolded proteins in the lumen of the ER, the UPR

adaptive defence mechanism is triggered. ATF6 is one of its three regulatory pathways. ATF6 has been shown to inhibit CFTR expression. The aim of this thesis project is to evaluate the effects of inhibiting S1P, a protein central for the activation of ATF6, on p.Phe508del-CFTR by pharmacological means. The results show that Cl⁻ ion efflux linked to the activity of the p.Phe508del-CFTR channel is increased through an increase in the overall expression and transport of this channel to the plasma membrane. We also give some possible explanations for these beneficial effects, in particular in relation to the triggering of the UPS, a pathway that allows mutated proteins to be transported to the plasma membrane.