



HAL
open science

Acide hyaluronique et inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose (CFILHA)

Antony Hoarau

► **To cite this version:**

Antony Hoarau. Acide hyaluronique et inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose (CFILHA). Sciences du Vivant [q-bio]. URCA, 2022. Français. NNT : 2022REIMS054 . tel-04402194

HAL Id: tel-04402194

<https://hal.univ-reims.fr/tel-04402194v1>

Submitted on 19 Jan 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.

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES - SANTÉ N°619

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Antony HOARAU

Le 24 juin 2022

Acide hyaluronique et inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose (CFILHA)

Thèse dirigée par le Docteur Christelle CORAUX et le Professeur Michel ABELY, Université de Reims Champagne-Ardenne

JURY

Mme Christelle CORAUX,	Chargée de recherche,	Université de Reims, France,	Directrice de thèse
M. Mohamed BENHAROUGA,	Maître de Conférences HDR,	Université de Grenoble, France,	Rapporteur
Mme Carole PLANES,	Professeure,	Université Paris 13, France,	Rapporteur
M. Olivier TABARY,	Chargé de Recherche HDR,	Sorbonne Université, France,	Examineur
M. Michel TARPIN,	Professeur,	Université de Reims, France,	Examineur
M. Michel ABELY,	Professeur,	Université de Reims, France,	Examineur



A la mémoire de mon Papa.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier Le Professeur Myriam Polette, Directrice de l'Unité INSERM UMR-S 1250, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire durant mes années de thèse.

Je souhaiterais remercier l'ensemble des membres du jury, Madame La Professeur Carole Planes de l'Université Paris 13 et Monsieur Le Docteur Mohamed Benharouga de l'Université de Grenoble pour avoir accepté de juger mon travail en qualité de rapporteur. Mes remerciements vont également au Professeur Michel Tarpin de l'Université de Reims, au Docteur Olivier Tabary de Sorbonne Université et au Professeur Michel Abély de l'Université de Reims pour leur participation à ma soutenance de thèse en tant qu'examineur. Merci pour vos précieux conseils et vos recommandations qui m'ont permis de faire avancer ce travail.

Christelle, un grand merci pour ton encadrement remarquable.

Je souhaite remercier le Docteur Zania Diabasana avec qui j'ai grandement partagé cette aventure. On a commencé ce parcours ensemble dans deux équipes différentes mais un grand merci de m'avoir montré qu'une situation peut toujours s'analyser dans les deux sens. Je me souviens de ces moments où l'on venait à l'improviste sur une chaise posée dans un coin de notre bureau pour pouvoir échanger sur tout. Nos discussions ont toujours été intéressantes. Un grand merci. Briii !

Je souhaiterais aussi remercier Madame le Docteur Emilie Luczka pour ton œil d'experte sur le bon déroulement de mes cultures notamment celles en interface air-liquide.

Je souhaite remercier l'ensemble des personnes représentant l'Unité INSERM UMR S-1250. Je dois avant toute chose préciser que c'est une chance en tant que doctorant d'avoir réalisé ma thèse au sein de ce laboratoire. Pour ça, je souhaite remercier tous ceux avec qui j'ai pu évoluer et apprendre au quotidien. Un grand merci à Adeline Germain avec qui j'ai appris énormément en biologie moléculaire. Ce projet autour du screening de CD44 était impressionnant mais content que l'on y soit arrivé. Je te souhaite naturellement une belle route pour la suite car je suis persuadé qu'elle sera productive. Un grand merci à Madame le Docteur Audrey Brisebarre pour l'ensemble de ses cours particuliers sur les biostatistiques qui, je

l'espère, porteront leurs fruits. Un grand merci pour ton aide concernant la revue ou encore le dot plot. Ça a l'air facile quand tu le fais !! Merci également à Madame le Docteur Lynda Saber-Chérif pour son aide et toutes les discussions.

Je souhaite également remercier Monsieur le Docteur Valérian Dormoy et Madame le Docteur Béatrice Nawrocki-Raby pour tous leurs conseils et encouragements qui m'ont beaucoup aidé tout au long de cette thèse.

Un grand merci à tous les anciens doctorants : Julie, Jordan pour votre accueil à mon arrivée et toutes nos discussions au sujet de ma thèse. Un grand merci à Randa pour tes conseils avant et pendant cette thèse. C'est en étant acharné du travail et en ayant la rage de réussir qu'on y arrive ! Un grand merci pour tout !

Un grand merci à tous ces doctorants et futurs Docteurs qui me suivent : à Théophile, pour ta gentillesse, tes petites barres chocolatées et surtout les débriefs Koh-Lanta qui vont me manquer. Je te souhaite le meilleur. A Cléopée, vraiment tu as une pêche d'enfer, même en étant une bosseuse, tu es toujours là pour entretenir la bonne humeur de l'équipe des doctorants. A Laure, nos discussions au sujet des thérapies protéiques de CFTR et autres vont beaucoup me manquer. « Y'a des fois, il ne faut pas trop réfléchir ! ». Même si tu as une voix qui porte, je t'ai donné cette étiquette de cheval de Troie à vie pour les raisons que l'on connaît. Merci pour tout, vraiment ! Merci à vous tous pour tous ces petits cadeaux, énigmes, activités, repas ou pauses cafés qui nous ont permis de renforcer la cohésion d'équipe des doctorants.

Je souhaite également remercier les anciens étudiants passés par « l'équipe muco » dont tu as fait partie, Maëva. Ton parcours universitaire est exemplaire, alors je te souhaite tout le meilleur pour la suite car tu es dans ton élément.

Un grand merci à toute l'aide technique et administrative dont on a la chance de profiter : un grand merci à Alexandre pour les nombreuses fois où je t'ai dérangé pour la réserve ou encore pour ton aide au nettoyage de la primaire L2. Un grand merci à Claire pour le nombre de fois où je t'ai dérangé pour des commandes urgentes de dernière minute, et pour la recette du café ahah! Merci à Nathalie pour tes conseils en immunocytochimie. Un grand merci également à Annie ; je te souhaite une retraite bien méritée, tu vas beaucoup manquer au laboratoire!

Je souhaite également remercier Madame le Docteur Christine Terryn et Monsieur le Docteur Arnaud Bonnomet du Plateau technique en Imagerie Cellulaire et Tissulaire (PICT), pour le temps passé à faire mes acquisitions, votre disponibilité et votre aide.

Un grand merci à Madame le Docteur Sylvie Pasco-Brassart, pour ces stages de Master-1/Master-2 et surtout pour les « mickey de Platine » et « mickey de Plomb » que j'ai sur mon bureau. Un grand merci Sylvie.

Sur un versant beaucoup plus personnel, la première personne que je remercierai est le Professeur émérite Abdel Belarbi. Tu as été l'un des meilleurs encadrants de stage, le plus grand Professeur tant dans les connaissances théoriques que pratiques. Tu es celui qui m'a tout appris et c'est avec toute cette reconnaissance que j'ai pour toi que je t'ai toujours nommé « mon père spirituel de la recherche ». Cette passion pour la recherche et cette rage à ne jamais abandonner sont aujourd'hui deux éléments que je mets au profit de ma passion! Je n'oublierai jamais cette phrase qui te caractérise très bien : « Les étudiants sont le progrès, ils sont là pour nous dépasser ! ». Vraiment un grand merci Abdel ! Un grand merci également à Madame le Docteur Sabine Gognies, qui fait partie de cette histoire sans qui tout ça n'aurait jamais été possible.

A tous ces amis que j'ai la chance d'avoir à mes côtés : Halima, Elodie, Aurélie, Julie, merci d'être toujours présentes depuis toutes ces années, vous êtes un soutien important. Toutes ces heures passées au téléphone, à se dire au revoir 2005 ou 2011 fois d'affilé. Vraiment j'ai beaucoup de chance de vous avoir avec moi, à chaque fois ! Un grand merci aussi à ce quatuor dont j'ai fait partie : Nesrine, la future Docteur Aubéri et Manon ; on a défoncé tous les TP, point. Ahah !! Un grand merci aussi à Avila pour toutes ces barres de rire et à Romain, Momo, et Mika et pour toutes ces soirées à chouffer au LBee ahaha !

Un grand merci à ma team de Reims : Jen, Alex et Momo, vous êtes un soutien omniprésent pour moi. Je souhaite à d'autres personnes d'avoir des amis aussi exceptionnels que vous. Vous êtes géniaux, et jamais je n'oublierai ce que vous faites pour moi au quotidien !! Ah ouiii !! Un grand merci également à Alison, Arthur (le botaniste, blessé !!), Fanny et Téo (yeah mamènee) pour votre soutien.

Je souhaite également remercier mon meilleur ami, mon frère, Romain ! Toi seul sait l'ensemble des étapes par lesquelles je suis passé pour en être là aujourd'hui. Cette thèse est

également le fruit de notre travail car tu as toujours été là quand j'avais besoin de soutien. Merci mon frère, YESSIR... MASOEUR !

Un grand merci à Chris Brown pour ses musiques qui m'ont motivé à arriver tous les matins tôt et déterminé, même les week-ends ☺ (Grass ain't greener, Red, Deuces, Take you Down, Hope you Do et plein d'autre), à Virgil Abloh (RIP) pour avoir montré à de nombreuses personnes que dans la vie tout est possible, à James Jebbia, le créateur de la marque Supreme, un mot qui demande de toujours faire de son mieux au labo, un Supreme work et enfin à Takashi Murakami, pour mettre de la joie avec toutes ces couleurs.

A mes frères, Adrien, Camille, Eddy et Ryan ; l'objectif est atteint mais pas encore le but, YESSIR ! Merci à tous les quatre d'avoir accepté cette passion que j'ai pour la biologie au détriment de l'absence de souvenirs avec vous. Aujourd'hui, je sais apprécier chaque moment à vos côtés car le manque se fait souvent sentir.

A ma petite amie, Emma, pour tout ton soutien et ton aide au quotidien. Ma thèse a été prolongée, pendant que la tienne a débuté, alors je remercierai à jamais ce destin qui nous a rassemblé. J'ai beaucoup de chance de faire partie de ta vie, alors je ferai tout pour que tu sois encore plus fière de moi, fière de nous. Un grand merci mon amour !

A ma maman, Françoise, qui arrêtera de dire « la maladie de Grégory Lemarchal » et à mon papa, Louis, qui nous a quittés pendant cette thèse. Papa, j'espère que de là où tu es, tu es fier de moi et fier de tes enfants ! Cette envie de tout connaître sur les gènes a commencé par nos discussions, dans le salon, à des heures tardives. Merci Papa pour cette compréhension des gènes sans même être biologiste mais en étant un excellent chercheur de connaissances. Avec le recul, je m'aperçois que ta culture personnelle sur les gènes n'était pas loin de la réalité. Ces aspects de recherche, d'observation et de compréhension m'ont toujours impressionné et je dois avouer qu'aujourd'hui, je me sens un peu comme toi. Un grand merci à mes parents !

Enfin, je vous souhaite à tous de toujours trouver la lumière dans ce que vous faites, car c'est avant tout elle qui éclaire vos idées, et puis si ce n'est pas le cas, dites-vous qu'une lumière peut s'éteindre mais surtout se rallumer ! Faites vivre vos passions à fond !

Allez Bisous.

ΔΥΤΟ ☺

RÉSUMÉ

La Mucoviscidose (*Cystic Fibrosis*, CF) est une maladie génétique rare à transmission autosomique récessive, due à des mutations du gène CFTR codant le canal chlore CFTR. Elle affecte différents organes sécréteurs notamment le tissu pulmonaire, générant une déshydratation, un épaissement et une accumulation de mucus qui entraîne une altération de la clairance mucociliaire. La modification du mucus favorise des infections qui deviennent chroniques dans les voies aériennes et s'accompagnent d'une inflammation pulmonaire importante. Notre étude visait à analyser les effets de l'acide hyaluronique (AH) sur la modulation de l'inflammation bronchique dans la mucoviscidose dans le but de déterminer son rôle anti-inflammatoire potentiel dans cette pathologie ainsi que dans les pathologies respiratoires inflammatoires chroniques.

Pour notre étude, le premier objectif a été d'étudier l'effet de l'AH de 40 kDa, en condition contrôle ou en contexte inflammatoire, sur la sécrétion d'IL-8 par différentes cellules épithéliales bronchiques cultivées en monocouche. Nos résultats montrent que, bien que l'AH ne modifie pas la sécrétion d'IL-8 par les lignées cellulaires, il entraîne une réduction significative de cette sécrétion dans les cultures primaires bronchiques CF et non-CF soumises à une inflammation chronique. Le second objectif a consisté à définir l'effet anti-inflammatoire préventif et/ou curatif de l'AH de 40 kDa sur les cellules bronchiques en culture en monocouche mais également, pour les cellules épithéliales bronchiques primaires, en culture en interface air-liquide. Les résultats obtenus montrent que l'AH de 40 kDa ne semble pas présenter d'effet protecteur contre le développement de l'inflammation bronchique, mais réduit curativement l'inflammation des cellules épithéliales dans un contexte inflammatoire. Enfin, nous nous sommes intéressés aux mécanismes mis en jeu lors de ce processus, en ciblant spécifiquement les récepteurs CD44 et TLR-4, et la voie de signalisation NF- κ B. Nos résultats montrent qu'en condition contrôle, l'AH de 40 kDa, tout en induisant une phosphorylation d'I κ B- α , n'entraîne pas d'activation de NF- κ B, alors qu'en condition inflammatoire, aucune activation d'I κ B- α ou de NF- κ B n'est observée sous l'action de l'AH de 40 kDa.

En conclusion, l'AH de 40 kDa a montré des propriétés anti-inflammatoires pour l'épithélium bronchique humain non-CF et CF enflammé, et pourrait ainsi présenter une activité pharmacologique bénéfique dans les pathologies respiratoires inflammatoires chroniques, en particulier la CF.

Mots clés : Remodelage, épithélium bronchique, inflammation, acide hyaluronique, mucoviscidose

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is an autosomal recessive genetic disease due to mutations in the *CFTR* gene encoding the CFTR chloride channel. CF affects various secretory organs, notably the lungs, leading to dehydration, thickening and accumulation of mucus in the airways, and consequently an alteration of the mucociliary clearance. This context favors airway chronic infections and inflammation. Our study aimed to analyze the effects of hyaluronic acid (HA) on the modulation of bronchial inflammation in cystic fibrosis in order to determine its potential anti-inflammatory role in this pathology as well as in chronic inflammatory respiratory diseases.

For our study, we used non-CF and CF cell lines, as well as human primary bronchial epithelial cells from non-CF subjects and CF patients (F508del/F508del mutation). The first objective of my thesis was to study the effect of 40 kDa-HA, in control condition or in an inflammatory context, on the secretion of IL-8 by the different bronchial epithelial cells cultured as monolayers. Our results showed that, although HA does not modify IL-8 secretion by cell lines, it leads to a significant reduction of this IL-8 secretion in inflamed primary non-CF and CF bronchial cultures. The second objective was to define the preventive and/or curative anti-inflammatory effect of 40 kDa-HA on CF bronchial cells cultured as monolayers and, for primary bronchial epithelial cells, at the air-liquid interface. The results we obtained showed that 40 kDa-HA does not seem to exhibit a protective effect against the development of bronchial inflammation, but curatively reduces the inflammation of epithelial cells in an inflammatory context. Finally, we focused on the mechanisms involved in this process, specifically targeting the CD44 and TLR-4 receptors, and the signaling pathways. Our results showed that in control condition, 40 kDa-HA, while inducing phosphorylation of I κ B- α , does not lead to activation of NF- κ B, whereas in inflammatory condition, no activation of I κ B- α or NF- κ B is observed under the action of 40 kDa-HA.

In conclusion, 40 kDa-HA exhibits anti-inflammatory properties for non-CF and CF inflamed bronchial epitheliums, and therefore may show beneficial pharmacological activity in chronic inflammatory respiratory diseases, especially in CF.

Keywords: Remodeling, airway epithelium, inflammation, hyaluronic acid, cystic fibrosis

TABLE DES MATIÈRES

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	13
ABRÉVIATIONS	14
LISTES DES FIGURES	20
LISTE DES TABLEAUX	23
INTRODUCTION	26
Chapitre 1 : L'Appareil Respiratoire Humain	26
1. Organisation de l'appareil respiratoire humain	26
1.1. La zone de conduction de l'air	26
1.2. La zone alvéolaire respiratoire	27
2. Tissu épithélial des voies aériennes	28
2.1. Les cellules de l'épithélium trachéo-bronchique.....	29
2.1.1. Les cellules basales.....	29
2.1.2. Les cellules ciliées	29
2.1.3. Les cellules intermédiaires ou parabasales	30
2.1.4. Les cellules caliciformes ou mucosécrétantes	30
2.2. Les cellules de l'épithélium bronchiolaire	31
2.2.1. Les cellules club	31
2.2.2. Les cellules neuroendocrines pulmonaires	32
2.3. Les cellules de l'épithélium alvéolaire.....	33
2.3.1. Les pneumocytes de type I.....	33
2.3.2. Les pneumocytes de type II	34
3. Fonctions de l'épithélium des voies aériennes humain.....	34
3.1. Ancrage cellulaire et fonction de barrière épithéliale.....	34
3.2. Transports ioniques associés à l'épithélium bronchique	37
3.2.1. Les canaux chlorure	38
3.2.1.1. Le canal CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)	38
3.2.1.2. Le canal chlorure rectifiant sortant ou ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel).....	38
3.2.1.3. Les canaux chlorure calcium dépendants (Calcium dependant Chloride Channels, CaCC)	39
3.2.2. Les canaux sodiques	40
3.2.2.1. Le Canal Épithélial à Sodium (ENaC-Epithelial Na ⁺ Channel)	40
3.2.2.2. La pompe Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	41
3.2.3. Les canaux potassiques	42
3.3. La clairance mucociliaire	43
3.3.1. Le liquide périciliaire.....	43
3.3.2. Le mucus.....	44

3.3.3.	Le battement ciliaire	45
Chapitre 2: La Mucoviscidose.....		49
1.	Epidémiologie de la mucoviscidose	49
2.	CFTR.....	50
2.1.	Du gène <i>CFTR</i> à la protéine CFTR.....	50
2.2.	Biosynthèse et dégradation de CFTR.....	52
2.3.	Localisation de CFTR	54
2.4.	Régulation du canal CFTR.....	56
2.5.	Fonctions du canal CFTR.....	58
2.5.1.	Transporteur anionique	59
2.5.2.	Transport du glutathion.....	59
2.5.3.	Régulation des canaux ioniques et transporteurs	60
2.5.3.1.	CFTR, régulateur de canaux chlorure	60
2.5.3.2.	CFTR, régulateur du canal potassique ROMK	61
2.5.3.3.	CFTR, régulateur du canal sodique ENaC	61
2.5.3.4.	CFTR, régulateur des aquaporines	61
2.5.4.	Régulation du pH.....	62
2.5.5.	Rôle dans l'inflammation	63
2.6.	Les mutations du gène <i>CFTR</i>	63
2.6.1.	Les mutations de classe I	65
2.6.2.	Les mutations de classe II.....	65
2.6.3.	Les mutations de classe III.....	65
2.6.4.	Les mutations de classe IV	66
2.6.5.	Les mutations de classe V.....	66
2.6.6.	Les mutations de classe VI	66
3.	Aspect clinique de la CF	68
3.1.	Diagnostics et dépistages de la CF.....	68
3.1.1.	Dépistages des enzymes pancréatiques.....	70
3.1.2.	Analyse génétique.....	70
3.1.3.	Test de la sueur	71
3.1.4.	Méthodes supplémentaires pour le diagnostic de la CF.....	72
3.1.4.1.	La différence de potentiel nasal	72
3.1.4.2.	Le courant de court-circuit sur biopsie rectale	73
3.2.	Manifestations cliniques de la CF pulmonaire	73
3.2.1.	Altérations de la clairance mucociliaire.....	74
3.2.2.	Les infections bactériennes	74
3.2.3.	Altération de la défense immunitaire et inflammation pulmonaire.....	74
3.2.4.	Pathologies pulmonaires associées à la CF.....	76
3.3.	Prise en charge de la pathologie pulmonaire dans la CF.....	76

3.3.1.	Approches thérapeutiques pour la clairance mucociliaire	77
3.3.2.	Approches thérapeutiques contre les infections bactériennes	77
3.3.3.	Approches thérapeutiques anti-inflammatoires	78
3.3.4.	La transplantation pulmonaire	79
3.3.5.	Les nouvelles approches thérapeutiques	79
3.3.5.1.	Les thérapies géniques	79
3.3.5.2.	Les thérapies protéiques.....	81
3.3.5.2.1.	Les correcteurs de CFTR.....	81
3.3.5.2.2.	Le potentiateur de CFTR	82
3.3.5.2.3.	Les stabilisateurs de CFTR.....	82
3.3.5.2.4.	Les amplificateurs de CFTR.....	83
3.3.5.2.5.	Les inducteurs de « translecture ».....	83
3.3.5.2.6.	Thérapies protéiques combinées	84
Chapitre 3 : Inflammation pulmonaire.....		88
1.	Les médiateurs de l'inflammation.....	88
2.	Les polynucléaires neutrophiles dans la CF	89
3.	Les macrophages dans la CF	91
4.	Le déséquilibre des cytokines inflammatoires	92
4.1.	L'interleukine 8	92
4.2.	L'interleukine-1 β	93
4.3.	Le facteur de nécrose tumorale- α	93
4.4.	L'interleukine-6.....	93
4.5.	Les leukotriènes.....	94
4.6.	L'interleukine-10.....	94
Chapitre 4 : Acide Hyaluronique.....		97
1.	Structure de l'Acide Hyaluronique	97
2.	Caractéristiques physico-chimiques de l'AH.....	97
3.	Les Hyaladhérines	99
3.1.	CD44	99
3.2.	RHAMM	101
3.3.	TLRs.....	101
3.4.	Stabiline-2 / HARE	102
3.5.	TSG-6.....	103
3.6.	LYVE-1	104
4.	Les fonctions associées à l'Acide Hyaluronique.....	104
4.1.	Acide hyaluronique et migration cellulaire.....	104
4.2.	Acide hyaluronique et prolifération cellulaire.....	105

4.3.	Acide hyaluronique et différenciation cellulaire	105
4.4.	Acide hyaluronique et apoptose	106
4.5.	Acide hyaluronique et transport mucociliaire	106
4.6.	Acide hyaluronique et processus inflammatoire (revue).....	106
OBJECTIFS DE LA THÈSE		123
MATÉRIELS ET MÉTHODES		126
1.	Culture cellulaire	126
1.1.	Prélèvements humains utilisés	126
1.2.	Dissociation des échantillons biologiques CF et non-CF.....	126
1.3.	Culture de cellules dissociées de résections bronchiques	127
1.4.	Lignées cellulaires bronchiques CF et non-CF	127
1.5.	Culture cellulaire dans l'étude de l'inflammation cellulaire	127
1.5.1.	Culture des lignées cellulaires bronchiques CF et non-CF	127
1.5.2.	Culture en monocouche des cellules épithéliales primaires bronchiques CF et non-CF ...	128
1.5.3.	Culture en Interface Air-Liquide (IAL) des cellules épithéliales primaires bronchiques CF et non-CF	128
2.	Les traitements cellulaires	129
2.1.	Stimulation inflammatoire des cellules en culture	129
2.2.	Préparation de l'AH-Na ⁺ de 40 kDa et stimulation des cellules	129
2.3.	Stimulation des cellules par la Dexaméthasone	130
2.4.	Co-traitement, traitement préventif et traitement curatif des cellules épithéliales bronchiques CF et non-CF cultivées en monocouche	130
3.	Mesure de la sécrétion de cytokines / chimiokines	131
3.1.	ELISA anti-IL-8	131
3.2.	Cytokine Array.....	132
4.	Analyse de la voie NF-κB / IκB-α par Western-blot	133
4.1.	Extraction des protéines totales et dosage.....	133
4.2.	Western-blot.....	133
5.	Immunocytochimie.....	134
6.	Analyse des cultures cellulaires par RT-qPCR	135
7.	Statistiques	136
RÉSULTATS		138
1.	Influence de l'AH sodique de 40 kDa sur des lignées cellulaires bronchiques CF et non-CF.....	138
1.1.	Analyse du phénotype inflammatoire des lignées cellulaires.....	138

1.2.	Analyse de la cinétique d'inflammation en présence ou non d'AH sodique de 40 kDa	139
1.3.	Analyse du rôle anti-inflammatoire potentiel de l'AH-Na ⁺ de 40 kDa.....	140
1.4.	Analyse du rôle anti-inflammatoire préventif potentiel de l'AH-Na ⁺ de 40 kDa.....	140
1.5.	Analyse du rôle anti-inflammatoire curatif potentiel de l'AH-Na ⁺ de 40 kDa.....	142
1.6.	Analyse de l'expression des ARNm codant l'interleukine-8 en cas de traitements préventifs et curatifs des cellules CF CuFi-1 par l'AH-Na ⁺ de 40 kDa	143
2.	Influence de l'AH-Na ⁺ de 40 kDa sur des cellules primaires bronchiques humaines CF et non-CF non différenciées cultivées en monocouches	144
2.1.	Analyse du rôle anti-inflammatoire potentiel de l'AH-Na ⁺ de 40 kDa.....	144
2.2.	Analyse du rôle anti-inflammatoire préventif potentiel de l'AH sodique de 40 kDa	145
2.3.	Analyse du rôle anti-inflammatoire curatif potentiel de l'AH sodique de 40 kDa....	146
3.	Influence de l'AH-Na ⁺ de 40 kDa sur des cellules primaires bronchiques humaines CF en culture en interface air-liquide.....	147
3.1.	Analyse du rôle anti-inflammatoire potentiel de l'AH-Na ⁺ de 40 kDa.....	147
3.2.	Analyse de l'expression d'un panel de chimiokines et de cytokines par les cellules primaires bronchiques CF cultivées en IAL et traitées par l'AH-Na ⁺ de 40 kDa	148
4.	Etude des mécanismes d'action de l'AH-Na ⁺ de 40 kDa.....	149
4.1.	Influence dose-dépendante de l'AH-Na ⁺ de 40 kDa sur l'inflammation des cellules non-CF	150
4.2.	Influence dose-dépendante de l'AH-Na ⁺ de 40 kDa sur l'activation de la voie NF-κB dans les cellules primaires bronchiques humaines non-CF.....	151
4.3.	Influence dose-dépendante de l'AH-Na ⁺ de 40 kDa sur l'expression et la localisation des hyaladhérines TLR-4 et CD44	153
	<i>SYNTHÈSE, DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</i>	<i>157</i>
1.	Synthèse et discussion.....	157
2.	Perspectives.....	162
	<i>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</i>	<i>166</i>

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications scientifiques

Lung Hyaluronasome: Involvement of Low Molecular Weight Ha (Lmw-Ha) in Innate Immunity

Antony Hoarau, Myriam Polette, Christelle Coraux.
Biomolecules **2022**, *12*(5), 658

Primary ciliogenesis is a crucial step for multiciliated cells determinism in the respiratory epithelium

Randa Belgacemi, Zania Diabasana, Antony Hoarau, Xavier Dubernard, Jean-Claude Mérol, Christophe Ruaux, Myriam Polette, Jeanne-Marie Perotin, Gaëtan Deslée, Valérian Domoy.
Journal of Cellular and Molecular Medicine, **2021**, *25*(15) : 7575-7579



Communications scientifiques par voies d'affiches

Modulation de l'inflammation bronchique dans la mucoviscidose par la molécule 3C ; A. HOARAU, E. LUCZKA, M. POLETTE, M. ABÉLY, C. CORAUX ; 20^{ième} colloque des jeunes chercheurs organisé par l'association Vaincre La Mucoviscidose (VLM), Institut Pasteur, Paris, France (26 février 2019).

Modulation de l'inflammation bronchique dans la mucoviscidose par la molécule 3C ; A. HOARAU, E. LUCZKA, M. POLETTE, M. ABÉLY, C. CORAUX ; Journées Jeunes Chercheurs Transfrontalières, Campus du Moulin de la Housse, Reims, France (3 avril 2019).

Modulation of the airway inflammation by 3C compound in the Cystic Fibrosis ; A. HOARAU, E. LUCZKA, M. POLETTE, M. ABÉLY, C. CORAUX, Summer School on epithelial Systems : Physiology and Pathophysiology, Lisboa, Portugal (22-26 July 2019).

Modulation de l'inflammation bronchique dans la mucoviscidose par la molécule 3C ; A. HOARAU, E. LUCZKA, M. POLETTE, M. ABÉLY, C. CORAUX ; La Journée Rémoises des Jeunes Chercheurs (JRJC), Reims, France (17 octobre 2019).

Modulation de l'inflammation bronchique dans la mucoviscidose par la molécule 3C ; A. HOARAU, E. LUCZKA, M. POLETTE, M. ABÉLY, C. CORAUX ; La Journée Rémoises des Jeunes Chercheurs (JRJC), Reims, France (14 février 2020).

ABRÉVIATIONS

A

AAV	<i>Virus Adéno-Associé</i>
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
ABEs	<i>Adenine Base Editors</i>
ACE	<i>Angiotensin-Converting Enzyme-2</i>
ADP	<i>Adénosine-DiPhosphate</i>
AH	<i>Acide Hyaluronique</i>
AMPc	<i>Adénosine MonoPhosphate cyclique</i>
ANO1	<i>Anoctamine-1</i>
ARNm	<i>Acide RiboNucléique messenger</i>
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
AQP3	<i>Aquaporine 3</i>
ASL	<i>Airways Surface Liquid</i>
ATP	<i>Adénosine-TriPhosphate</i>

B

Ba²⁺	<i>Cation divalent de Baryum</i>
BEGM	<i>Bronchial Epithelial cell Growth Medium</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>

C

CaCC	<i>Calcium-Activated Chloride Channels</i>
CaMK II	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependant protein Kinase II</i>
Cas9	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
CBEs	<i>Cytosine Base Editors</i>
CBF	<i>Fréquence du Battement Ciliaire</i>
CCC	<i>Courant de Court-Circuit</i>
CCSP	<i>Club Cell Secretory Protein</i>
CC10	<i>Club Cell 10 kDa protein</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CEBPB	<i>CCAAT Enhancer-Binding Protein Beta</i>
CF	<i>Cystic Fibrosis</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
CFTR-RD	<i>CFTR-Related Disorders</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
CK	<i>CytoKératines</i>
CIC	<i>Chloride Channel</i>
CRCM	<i>Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose</i>

CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
crRNA	<i>crispr RNA</i>
Cs⁺	<i>Cation de Césium</i>
CVF	<i>Capacité Vitale Forcée</i>
CXCL1	<i>C-X-C motif chemokine Ligand 1</i>
CXCR1	<i>C-X-C motif chemokine Receptor-1</i>

D

DAMP	<i>Danger-Associated Molecular Pattern</i>
DAPI	<i>4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole</i>
DPP-1	<i>Dipeptidyl Peptidase-1</i>
DNN	<i>Dépistage Néonatal</i>
DO	<i>Densité Optique</i>
DPN	<i>Différence de Potentiel Nasal</i>

E

ECBC	<i>Examen CytoBactériologique des Crachats</i>
EDTA	<i>Acide Ethylène Diamine TétraAcétique</i>
EFR	<i>Epreuves Fonctionnelles Respiratoires</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ENaC	<i>Epithelial Na⁺ Channel</i>
Endo H	<i>Endoglycosidase H</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>

F

FAK1	<i>Focal Adhesion Kinase-1</i>
FokI	<i>Flavobacterium okeanoikoites endonuclease I</i>

G

GAG	<i>GlycosAminoGlycane</i>
GAPDH	<i>GlycérAldéhyde 3-Phosphate DésHydrogénase</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GlcNAc	<i>N-acétylglucosamine</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
GRP	<i>Gastrin-Releasing Peptide</i>
GSNO	<i>S-Nitrosogluthation</i>
GSNOR	<i>S-Nitrosogluthatione Reductase</i>
GTEX	<i>Gentoype-Tissue Expression</i>

GWAS *Genome Wide Association Study*

H

HARE	<i>Hyaluronic Acid Receptor for Endocytosis</i>
HAS	<i>Hyaluronan Synthases</i>
HDR	<i>Homology Directed Repair</i>
HEPES	<i>Acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HMW-HA	<i>High Molecular Weight-Hyaluronic Acid</i>
HOCL	<i>Acide hypochloreux</i>
H₂O₂	<i>Peroxyde d'hydrogène</i>
HRP	<i>HorseRadish Peroxidase</i>

I

IAL	<i>Interface Air-Liquide</i>
ICM	<i>Intestinal Current Measurement</i>
IFN	<i>Interféron</i>
IgA	<i>Immunoglobuline A</i>
IκB-α	<i>Inhibitor protein kappa B-alpha</i>
IL	<i>Interleukine</i>
INED	<i>Institut National d'Etudes Démographiques</i>
IRAK-M	<i>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase</i>
IRE1α	<i>Inositol-Requiring transmembrane kinase/endoribonuclease-1 alpha</i>
IRM	<i>Imagerie par Résonance Magnétique</i>

J

JAM	<i>Junctional Adhesion Molecule</i>
------------	-------------------------------------

K

K_{ATP}	<i>ATP-dependant K⁺ channel</i>
kb	<i>kilobase</i>
kDA	<i>kilo-Dalton</i>
kpb	<i>kilo-paire de bases</i>

L

LBA	<i>Lavage Broncho-Alvéolaire</i>
LMW-HA	<i>Low Molecular Weight-Hyaluronic Acid</i>
LPS	<i>LipoPolySaccharide</i>
LTB₄	<i>Leukotriènes B₄</i>

LYVE-1 *Lymphatic Vessel Endothelial receptor-1*

M

MAPK *Mitogen-Activated Protein Kinases*
MBL2 *Mannose-Binding Lectine 2*
MD-2 *Myeloid Differentiation protein-2*
MEC *Matrice Extracellulaire*
MEM *Minimum Essential Media*
MIF *Macrophage migration Inhibitory Factor*
MIP-1 α *Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha*
MMP *Matrix Metalloproteinase*
MMW-HA *Medium Molecular Weight-Hyaluronic Acid*
MPO *Myélopéroxydase*
MUC *Mucine*
MyD88 *Myeloid Differentiation primary response 88*

N

NBD1/2 *Nucleotide Binding Domain-1/2*
NE *Neutrophil Elastase*
NEB *NeuroEpithelial Bodies*
NETs *Neutrophil Extracellular Traps*
NF- κ B *Nuclear Factor-kappa B*
NGS *Next-Generation Sequencing*
NHERF-1 *Na⁺/H⁺ Exchange Regulatory Factor-1*
NKCC *N⁺/K⁺/2 Cl⁻ Co-transporter*
NLR *Nod-Like Receptors*
NO *Oxyde nitrique / monoxyde d'azote*
NOS1/3 *Nitric Oxide Synthase-1/3*

O

o-HA *oligo-Hyaluronic Acid*
ORCC *Outwardly Rectifying Chloride Channel*

P

PAGE *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
PAMP *Pathogen-Associated Molecular Pattern*
PAP *Protéine Associée à la Pancréatite*
PBS *Phosphate Buffered Saline*
PCR *Polymerase Chain Reaction*
PECAM-1 *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*
pegRNA *Prime editing guide-RNA*

pH	<i>potentiel Hydrogène</i>
Pi	<i>Phosphate inorganique</i>
PKA	<i>Protéines Kinases A</i>
PKC	<i>Protéines Kinases C</i>
PNI/II	<i>Pneumocytes de type I/II</i>
PNN	<i>PolyNucléaires Neutrophiles</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PRSS1	<i>Serine Protease-1 (Trypsin-1)</i>
PTC	<i>Premature Termination Codon</i>
PVDF	<i>Polyfluorure de vinylidène</i>

Q

QSP	<i>Quantité Suffisante Pour</i>
------------	---------------------------------

R

RD	<i>Regulatory Domain</i>
RE	<i>Réticulum Endoplasmique</i>
RHAMM	<i>Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility</i>
RIPA	<i>RadioImmunoPrecipitation Assay</i>
RLR	<i>Retinoic acid-inducible gene I-Like Receptors</i>
RNA-Seq	<i>Séquençage de l'ARN / du transcriptome</i>
ROMK	<i>Renal Outer Medullary K⁺ Channel</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription-quantitative PCR</i>

S

SAA	<i>Serum Amyloid protein A</i>
SCGB	<i>Secretoglobin</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering Ribonucleic Acid</i>
SLC	<i>Solute-linked Carrier</i>
SLPI	<i>Secretory Leukocyte Protease Inhibitor</i>
SNO	<i>S-nitrosothiol</i>
SNP	<i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>
SOD	<i>SuperOxyde Dismutase</i>
SP-A/B/D	<i>Surfactant Proteins-A/B/D</i>
Stab-2	<i>Stabiline-2</i>
STM	<i>Segment TransMembranaire</i>
SVF	<i>Sérum de Veau Fœtal</i>

T

TA	<i>Température ambiante</i>
TALEN	<i>Transcription Activator-Like Effector Nucleases</i>
TARS	<i>Threonyl-tRNA Synthetase</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TIR	<i>Trypsine ImmunoRéactive</i>
TIRAP	<i>Toll/Interleukin Receptor-containing Adapter Protein</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TMD	<i>TransMembrane Domain</i>
TMEM16	<i>TransMembrane protein-16</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
tracrRNA	<i>trans-activating crRNA</i>
TRAF6	<i>TNF-Receptor Associated Factor-6</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
TSG-6	<i>Tumor necrosis factor-Stimulated Gene-6</i>

U

UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
------------	----------------------------------

V

VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEMS	<i>Volume d'Expiration Maximal par Seconde</i>
vHMW-HA	<i>very High Molecular Weight-Hyaluronic Acid</i>

W

WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
WT	<i>Wild Type</i>

X

XBP1	<i>X-box Binding Protein-1</i>
-------------	--------------------------------

Z

ZFN	<i>Zinc Finger Nucleases</i>
ZO-1	<i>Zonula Occludens-1</i>

LISTES DES FIGURES

Figure 1: organisation de l'appareil respiratoire humain.....	27
Figure 2: structure des voies aériennes respiratoires inférieures	28
Figure 3: les jonctions cellulaires.....	37
Figure 4: la clairance mucociliaire	47
Figure 5: prévalence de la CF par département..	50
Figure 6: la protéine CFTR	52
Figure 7: biosynthèse et dégradation de la protéine CFTR.....	53
Figure 8: expression globale de la protéine CFTR humaine sauvage.....	54
Figure 9: caractérisation des cellules épithéliales CFTR positives au sein des bronches et des bronchioles humaines saines	55
Figure 10: localisation de la protéine CFTR sauvage versus F508del homozygote.	56
Figure 11: régulation ATP-dépendante de l'ouverture/fermeture du canal CFTR	57
Figure 12: fonctions de CFTR.....	58
Figure 13: représentation schématique illustrant le rôle de CFTR sur le pH intracellulaire des phagosomes des macrophages des voies aériennes humaines	62
Figure 14: les différentes mutations du gène CFTR	64
Figure 15: classes de mutations du gène CFTR	64
Figure 16: algorithme de prise en charge et du suivi des nourrissons dans le dépistage de la CF	69
Figure 17 : physiopathologie de la CF.	75
Figure 18: impacts des modulateurs de CFTR sur les différents variants de CFTR.....	84
Figure 19: modèle d'inflammation neutrophilique CF	91
Figure 20: vue simplifiée de la réponse inflammatoire des voies respiratoires dans la CF	95
Figure 21: structure chimique de l'acide hyaluronique	97
Figure 22: épissage alternatif du récepteur CD44 humain.....	100
Figure 23: PAMPs et DAMPs associés aux récepteurs TLRs	102
Figure 24: interactions de l'acide hyaluronique avec ses différentes hyaladhérines et cascades de signalisation à l'origine des fonctions cellulaires et tissulaires de l'AH.....	104
Figure 25: influence de l'AH sodique sur le remodelage et la régénération de l'épithélium CF	124
Figure 26: culture en monocouche des cellules primaires bronchiques CF et non-CF.....	128

Figure 27: culture en Interface Air-Liquide des cellules primaires bronchiques CF et non-CF	129
Figure 28: schéma des traitements préventifs et curatifs des cellules CF et non-CF.....	131
Figure 29: principe de détection des protéines par le kit Proteome Profiler Human Cytokine Array.....	132
Figure 30 : analyse du phénotype inflammatoire de lignées cellulaires bronchiques.	139
Figure 31 : cinétiques d'inflammation des lignées cellulaires bronchiques NuLi-1 et CuFi-1, et influence de l'AH-Na ⁺	140
Figure 32: sécrétion de l'IL-8 par les lignées bronchiques traitées ou non par l'AH-Na ⁺	141
Figure 33: sécrétion de l'IL-8 par les lignées bronchiques après traitement préventif ou non par l'AH-Na ⁺	142
Figure 34: sécrétion de l'IL-8 par les lignées bronchiques en cas de traitement curatif par l'AH-Na ⁺ de 40 kDa.	143
Figure 35: expression par RT-qPCR des ARNm de l'interleukine-8 en condition de traitement préventif et curatif des cellules CF CuFi-1 par l'AH-Na ⁺ de 40 kDa.	144
Figure 36: sécrétion de l'IL-8 par les cellules primaires bronchiques CF et non-CF traitées ou non par l'AH-Na ⁺ de 40 kDa.....	145
Figure 37: sécrétion de l'IL-8 par les cellules primaires épithéliales bronchiques humaines après traitement préventif ou non par l'AH-Na ⁺	146
Figure 38: sécrétion de l'IL-8 par les cellules primaires bronchiques CF et non-CF en cas de traitement curatif par l'AH-Na ⁺ de 40 kDa.....	147
Figure 39: sécrétion de l'IL-8 par les cellules primaires bronchiques CF cultivées en IAL en cas de traitement par l'AH-Na ⁺ de 40 kDa dans la chambre basale.	148
Figure 40: sécrétion de chimiokines et de cytokines par les cellules primaires bronchiques CF cultivées en IAL.	149
Figure 41: sécrétion d'IL-8 par les cellules primaires bronchiques humaines non CF sous l'effet de concentration croissante d'AH-Na ⁺ de 40 kDa.	150
Figure 42: analyse par western blotting de la voie NF-κB dans les cultures de cellules primaires bronchiques non-CF traitées avec des doses croissantes d'AH-Na ⁺ de 40 kDa en absence de contexte inflammatoire.....	151
Figure 43 : analyse par western blotting de la voie NF-κB dans les cultures de cellules primaires bronchiques non-CF traitées avec des doses croissantes d'AH-Na ⁺ de 40 kDa en présence d'un contexte inflammatoire (Cytomix).	152

Figure 44: analyse immunocytochimique de l'expression de TLR-4 et CD44 par les cellules primaires bronchiques non-CF.....	154
Figure 45: effets de l'AH-Na ⁺ de 40 kDa sur expression des différentes isoformes de CD44 par les cellules primaires bronchiques humaines non-CF.....	155
Figure 46: hypothèses associées aux rôles de l'AH de bas poids moléculaire dans un contexte inflammatoire	162

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: mutations majoritaires du gène <i>CFTR</i> en fonction des différentes classes en France	67
Tableau 2: mutations du gène <i>CFTR</i> en fonction de leur classification phénotypique.....	71
Tableau 3: stratégies thérapeutiques et traitements associés aux variants <i>CFTR</i>	86
Tableau 4: principaux récepteurs de reconnaissances de motifs moléculaires de l'immunité innée et exemples de leurs ligands (PAMP/DAMP).....	89
Tableau 5: résumé et signification pathologique de la taille de l'AH <i>in vivo</i>	99
Tableau 6: anticorps utilisés pour le western-blot	134
Tableau 7: anticorps utilisés en immunocytochimie	135
Tableau 8: liste des amorces utilisées en RT-qPCR.....	135

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : L'APPAREIL RESPIRATOIRE HUMAIN

INTRODUCTION

Chapitre 1: L'Appareil Respiratoire Humain

1. Organisation de l'appareil respiratoire humain

L'appareil respiratoire est organisé en deux entités distinctes : les voies aériennes et le parenchyme pulmonaire. Les voies aériennes ont une structure tubulaire et leur classification est définie en fonction de leur rang de division ainsi que de leur structure. Ainsi se distingue les voies aériennes extra-pulmonaires supérieures regroupant les fosses nasales, le pharynx, le larynx et les voies aériennes extra-pulmonaires inférieures comprenant la trachée et les bronches souches ou principales. À l'inverse des voies extra-pulmonaires, les voies aériennes intra-pulmonaires regroupant les bronches lobaires, les bronches segmentaires et les différentes générations de bronche ainsi que les bronchioles. En raison de son organisation anatomique, l'appareil respiratoire comporte une zone conductrice de l'air et une zone respiratoire ou alvéolaire, appelée également le parenchyme pulmonaire (**Figure 1 ►**). La zone conductrice de l'air véhicule les gaz respiratoires du milieu environnant, depuis les fosses nasales jusqu'aux bronchioles terminales. La zone alvéolaire effectue, quant à elle, la totalité des échanges gazeux respiratoires entre l'air et le sang au niveau de la barrière alvéolo-capillaire.

1.1. La zone de conduction de l'air

Le développement du poumon s'effectue à partir de l'endoderme et du mésoderme. Dès la 4^{ème} semaine du développement embryonnaire, un diverticule apparaît à la face centrale de l'intestin pharyngien et s'allonge pour donner naissance au bourgeon trachéal, qui va lui-même se diviser en deux bourgeons bronchiques. Ces derniers vont se diviser à plusieurs reprises, de façon symétrique et asymétrique pour donner naissance aux différentes générations de bronches. À la 24^{ème} semaine de développement, les bronches se sont ramifiées à dix-sept reprises jusqu'à former les bronchioles respiratoires.

Au sein de la portion conductrice, la dichotomie des voies aériennes permet de définir leur génération. La trachée va se dédoubler pour donner naissance aux deux bronches souches droite et gauche (1^{ère} génération) qui vont rejoindre leur propre poumon au niveau d'une région anatomique, le hile. La bronche souche droite se subdivise en bronches lobaires supérieure, moyenne et inférieure correspondant aux trois lobes du poumon droit. En revanche, la bronche souche gauche se dédouble en deux bronches lobaires supérieure et inférieure correspondant à

l'organisation anatomique du poumon gauche avec deux lobes. Les bronches lobaires (2^{ème} génération) vont à leur tour se diviser en bronches segmentaires et sous-segmentaires (3^{ème} à 8^{ème} génération). Ces dernières vont se ramifier pour former les bronchioles, d'un diamètre compris entre 0,5- 1 mm, qui à leur tour, vont se subdiviser en bronchioles terminales, avec un diamètre inférieur à 0,5 mm et constituant les dernières voies de conduction de l'air (9^{ème} à 16^{ème} génération).

1.2. La zone alvéolaire respiratoire

La zone alvéolaire est une interface d'échanges gazeux respiratoires entre l'air et le sang au niveau de la barrière alvéolo-capillaire et constitue l'élément fondamental de l'activité des poumons. Elle naît de la subdivision des bronchioles terminales en bronchioles respiratoires (17^{ème} à 19^{ème} génération) qui à leur tour se subdivisent en plusieurs conduits alvéolaires. Autour de ces conduits alvéolaires se trouvent un grand nombre de sacs alvéolaires et d'alvéoles renfermés au sein d'un lobule pulmonaire. Le développement embryonnaire de la zone alvéolaire se met en place de la 16^{ème} à la 26^{ème} semaine par l'apparition des bronchioles respiratoires, des conduits alvéolaires et des alvéoles primitives (20^{ème} à 23^{ème} génération). Cette structure se développe en continu jusqu'à la naissance et de façon post-natale jusqu'à l'âge d'environ 18 mois.

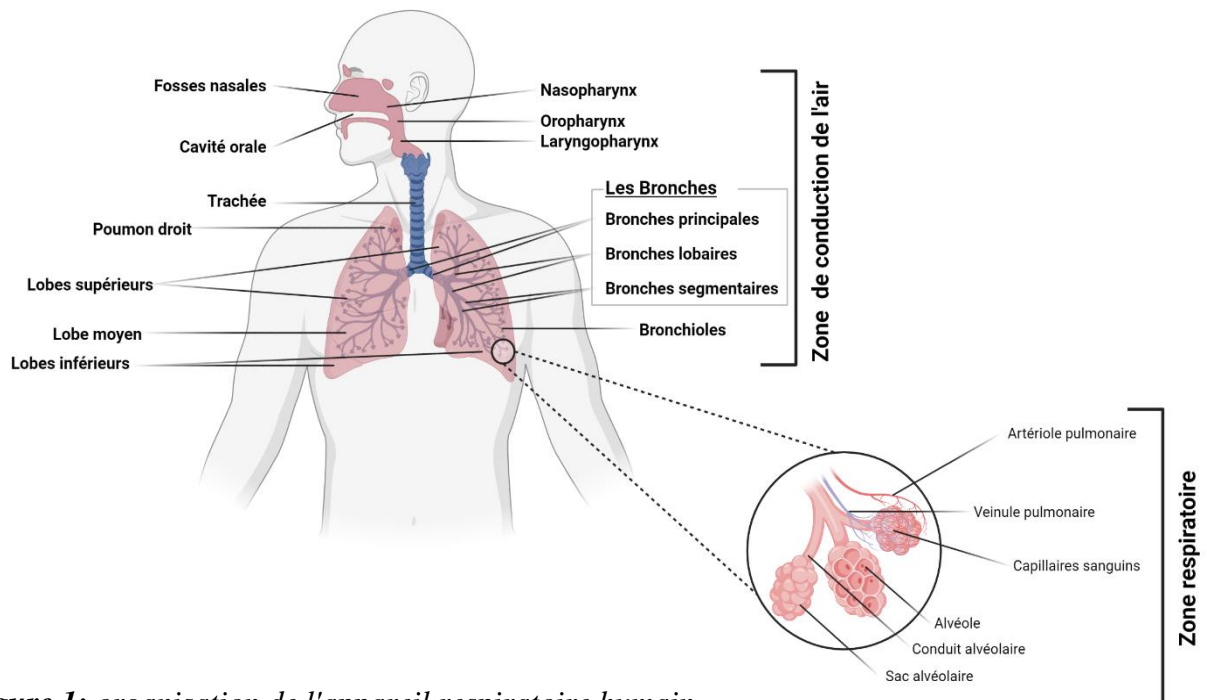


Figure 1: organisation de l'appareil respiratoire humain.

2. Tissu épithélial des voies aériennes

La trachée, les bronches et les larges bronchioles sont tapissées par un épithélium cylindrique pseudo-stratifié d'une épaisseur d'environ 20 μm , bordant les voies aériennes et respiratoires. Les épithéliums trachéo-bronchique, bronchiolaire et alvéolaire reposent sur une lame basale sur laquelle viennent s'arrimer les cellules ciliées, les cellules basales et les cellules sécrétrices (Adam *et al.*, 2014; Kaltreider *et al.*, 1987; Zepp and Morrissey, 2019) (**Figure 2 ▼**). Comme tout épithélium, ces cellules sont jointives les unes aux autres par un réseau de jonctions intercellulaires formant ainsi un ensemble cohésif renforçant le rôle de barrière physique vis-à-vis des pathogènes inhalés et autres contaminants.

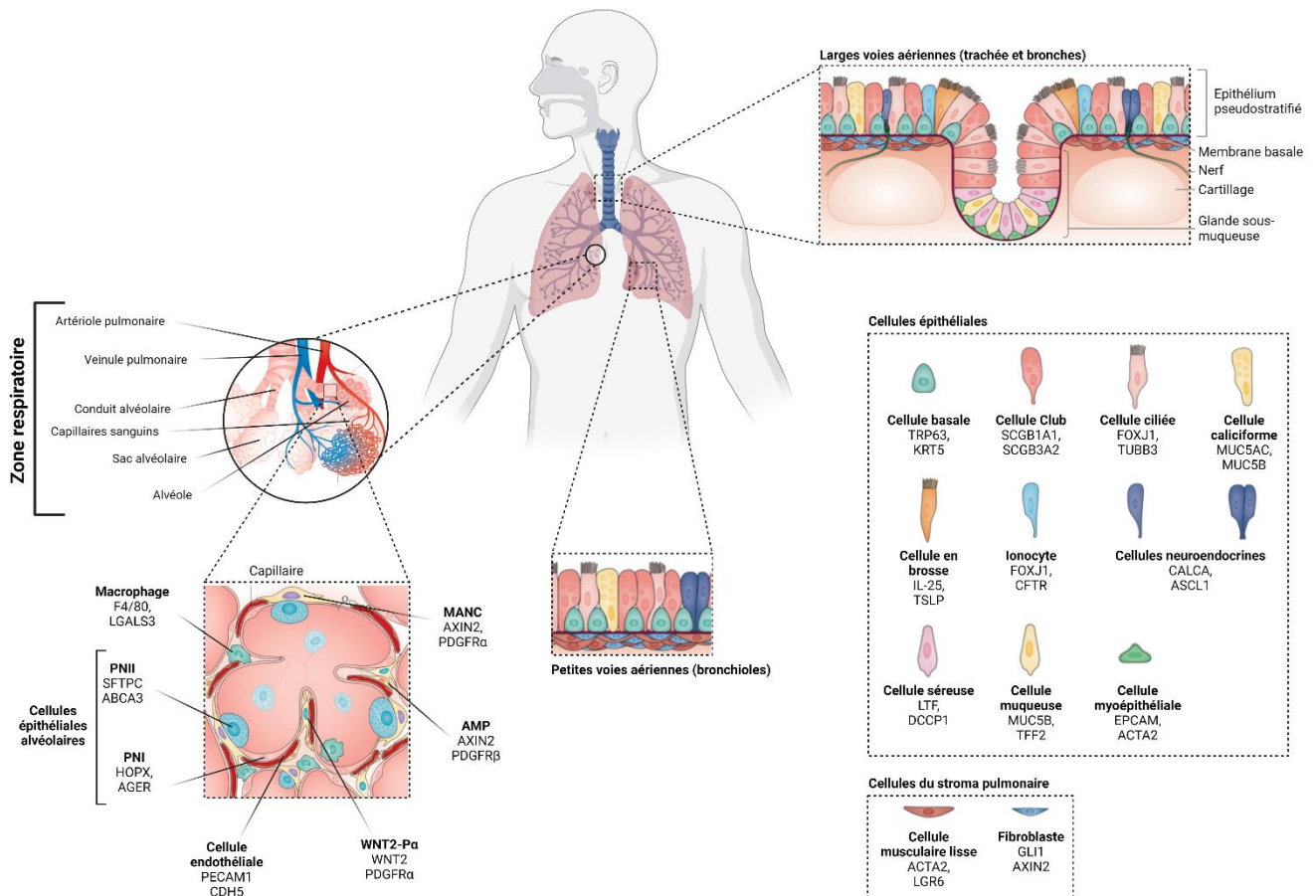


Figure 2: structure des voies aériennes respiratoires inférieures (thèse de Zania Diabasana « implication du polymorphisme rs16969968 de la sous-unité $\alpha 5$ des récepteurs nicotiques dans l'homéostasie pulmonaire et la bronchopneumopathie chronique obstructive », Thèse de doctorat en science de la vie et de la santé, sous la direction du Professeur Gaëtan Deslée et le Docteur Valérian Dormoy, Reims, INSERM UMR-S1250, 2021).

2.1. Les cellules de l'épithélium trachéo-bronchique

L'épithélium trachéo-bronchique est composé principalement de cellules ciliées, de cellules caliciformes mucosécrétantes, de cellules intermédiaires et de cellules basales (Breeze and Wheeldon, 1977).

2.1.1. Les cellules basales

Les cellules basales représentent environ 30 % des cellules de l'épithélium mucociliaire pseudostratifié mais recouvrent jusqu'à 90 % la surface de la lame basale chez l'Homme (Mercer *et al.*, 1994). Ce sont de petites cellules pyramidales, situées à la base de l'épithélium en contact direct avec la lame basale. En revanche, elles ne sont pas en contact avec la lumière des voies respiratoires car elles n'atteignent pas la surface de l'épithélium. Elles présentent un rapport noyau sur cytoplasme élevé. Ces cellules mettent en place des jonctions adhérentes de type hémidesmosome à leur pôle basal (*voir le Chapitre 3.1 Ancrage cellulaire et fonction de barrière épithéliale*), ce qui leur permet de s'accrocher fortement à la lame basale. Par le biais des desmosomes, elles établissent des jonctions intercellulaires avec les cellules ciliées et les cellules sécrétrices permettant de consolider la structure de l'épithélium (Evans *et al.*, 1989). Elles se retrouvent tout au long des divisions successives des voies aériennes et ont la particularité d'être progénitrices, c'est-à-dire qu'elles peuvent être amenées à se différencier en cellules ciliées ou en cellules caliciformes (Rodolphe Hajj *et al.*, 2007; Rock *et al.*, 2009). Les cellules basales de l'épithélium bronchique mature humain expriment de façon spécifique certaines protéines des filaments intermédiaires parmi lesquelles se trouvent notamment les cytokératines 5 (CK5), 13 (CK13), et 17 (CK17), ainsi que la protéine p63 (Daniely *et al.*, 2004; Dupuit *et al.*, 1995). De par leur rôle de progéniteur, les cellules basales interviennent dans les processus de réparation et de régénération de l'épithélium des voies aériennes, leur donnant un rôle majeur dans la plasticité épithéliale des voies aérienne.

2.1.2. Les cellules ciliées

Les cellules ciliées représentent environ 56 % des cellules de l'épithélium trachéo-bronchique avec un ratio de cinq cellules ciliées pour une cellule caliciforme (Wanner *et al.*, 1996). Ce sont des cellules allongées, cylindriques, d'une hauteur d'environ 20 μm pour une largeur de 7 μm . Ces cellules sont en contact direct avec la lumière des voies aériennes et reconnaissables par la présence de nombreux cils vibratiles apicaux (200 à 300 cils par cellule,

de 5 à 7 μm de longueur). Elles ont un cytoplasme riche en mitochondries, organites de production d'énergie sous forme d'Adénosine-TriPhosphate (ATP) nécessaire aux battements ciliaires. Ces cils oscillent de façon régulière et coordonnée à une fréquence comprise entre 10 et 15 Hertz (Zahm *et al.*, 1989). Ils ne sont pas directement immergés dans la couche de mucus mais dans un fluide de surface cellulaire, beaucoup moins visqueux que le mucus, nommé liquide de surface ou liquide périciliaire. Le rôle des cils est de permettre le transport du mucus qui les recouvre vers le pharynx, afin d'éliminer les débris cellulaires et les substances étrangères inhalées. Enfin, les cellules ciliées sont capables de réguler l'équilibre des flux ioniques et hydriques nécessaires au maintien de l'homéostasie de l'épithélium trachéo-bronchique. Pour cela, elles expriment les canaux CFTR et ENaC, localisés au niveau de la membrane plasmique apicale, assurant de manière respective le transport transépithélial des ions chlorure et sodium (Puchelle *et al.*, 1992).

2.1.3. Les cellules intermédiaires ou parabasales

Les cellules intermédiaires représentent 7 % des cellules de l'épithélium trachéo-bronchique et sont absentes des voies de conduction les plus distales (Boers *et al.*, 1998). Ce sont des cellules fusiformes ancrées à la lame basale mais qui n'atteignent pas la lumière des voies respiratoires. Ces cellules seraient issues de la division des cellules caliciformes au cours du processus de stratification (Jeffery and Li, 1997). À l'inverse, leur étude en microscopie électronique en transmission a permis d'observer des similitudes morphologiques avec les cellules basales, bien que leur noyau soit en position supra-basale. Leur étude permettrait de confirmer leur origine mais également leur rôle qui reste encore méconnu.

2.1.4. Les cellules caliciformes ou mucosécrétantes

Les cellules caliciformes, sécrétrices ou encore mucosécrétantes peuvent représenter entre 5 à 15 % de la population cellulaire au niveau de l'épithélium trachéo-bronchique sain avec une densité d'environ 7 000 cellules sécrétrices / mm^2 contre 10 000 cellules sécrétrices / mm^2 pour certaines pathologies respiratoires. Ces cellules possèdent un noyau en position basale et des granules sécrétoires de différentes tailles en position apicale, peu denses aux électrons et contenant des mucines. Ces mucines sont à l'origine de la formation du mucus. Les cellules caliciformes peuvent présenter des microvillosités au niveau de la membrane luminale lorsqu'elles sont immatures (Breeze and Wheeldon, 1977). Dans le cas de pathologies

inflammatoires ou lorsque l'épithélium est agressé par des particules xénobiotiques, le nombre de cellules caliciformes peut augmenter de même que la sécrétion de mucus (Turner *et al.*, 2011). La composition du mucus et ses différentes fonctions associées à l'épithélium bronchique seront développées plus loin (*voir Chapitre 3.3 La clairance mucociliaire*).

2.2. Les cellules de l'épithélium bronchiolaire

Chez l'Homme, au fur et à mesure des divisions bronchiolaires, des changements histologiques apparaissent. L'épithélium des premières générations de bronchioles est un épithélium cylindrique composé de cellules ciliées, de cellules caliciformes, de quelques cellules basales, moins nombreuses qu'au niveau de l'épithélium trachéo-bronchique et de cellules sécrétrices de type cellules Club. Les générations suivantes de bronchioles renferment, quant à elles, un épithélium prismatique cilié avec des cellules caliciformes, des cellules Club et des cellules neuroendocrines. Par la suite, au sein de bronchioles plus petites, l'organisation de l'épithélium se définit comme simple, cubique, cilié dépourvu de cellules caliciformes mais présentant des cellules Club et des cellules neuroendocrines. Enfin, au niveau des bronchioles terminales, l'épithélium ne présente plus que des cellules Club. Ainsi, au fur et à mesure des divisions bronchiolaires, l'épithélium comprend moins de cellules muqueuses et de cellules basales, davantage de cellules ciliées, et apparaissent de nouveaux types cellulaires comme les cellules Club et les cellules neuroendocrines.

2.2.1. Les cellules club

Les cellules Club, autrefois nommées cellules de Clara, ont été découvertes en 1937 par l'anatomiste allemand Max Clara (1899-1966). Depuis 2013, ces cellules ont été renommées cellules Club pour ne plus honorer la mémoire de cet anatomiste.

Les cellules Club sont situées principalement dans les bronchioles. Ce sont des cellules sécrétoires non-ciliées. Elles possèdent un pôle apical en dôme faisant saillie dans la lumière bronchiolaire et sont entourées de cellules ciliées. Ce sont des cellules claires, riches en mitochondries apicales avec un réticulum endoplasmique rugueux très développé. Les cellules Club possèdent des grains de sécrétion denses aux électrons en microscopie électronique en transmission localisés au pôle apical de la cellule.

Les cellules Club sont impliquées dans la synthèse et la sécrétion de différentes protéines parmi lesquelles se trouvent la protéine Club Cell Secretory Protein (CCSP) également appelée Secretoglobin (SCGB)1A1 ou encore Club Cell 10 kDa (CC10, Kilo Dalton). Wang *et al.* (2010) ont montré dans un modèle murin que l'inactivation du gène *scgb1a1* entraînait une inflammation exagérée des voies respiratoires en réponse à un stimulus allergique ainsi qu'à des infections bactériennes et virales, en comparaison à la réponse de souris sauvages (Wang *et al.*, 2010). Ils ont confirmé, par la suite, que la protéine CC10 avait des propriétés anti-inflammatoires et participait à la réparation tissulaire (Wong *et al.*, 2009). D'autres protéines sont également sécrétées par les cellules Club comme certaines protéines du surfactant, les Surfactant Protein-A, B et D (SP-A, -B, et -D), la protéine SGB3A2 ou encore la protéine CC-27.

De manière générale, les cellules club remplissent trois fonctions principales. En effet, elles synthétisent, stockent et sécrètent des protéines à fonction anti-inflammatoire contenues dans le liquide péri-ciliaire qui tapisse les voies aériennes. Elles participent également à la protection des voies respiratoires via le mécanisme de clairance mucociliaire et par leur capacité de détoxification des substances xénobiotiques et des gaz irritants inhalés. Enfin, elles agissent en qualité de cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire et participent ainsi à son renouvellement (Evans *et al.*, 1978).

2.2.2. Les cellules neuroendocrines pulmonaires

Les cellules neuroendocrines pulmonaires font partie du système endocrinien diffus. Le terme « neuroendocrine » est utilisé pour désigner ces cellules dont le phénotype est caractérisé par l'expression simultanée de propriétés de cellules endocrines et de neurones. Cependant, il a été démontré que ces cellules ont une origine endodermique et non de la crête neurale.

D'un point de vue histologique, les cellules neuroendocrines sont de forme pyramidale, en contact avec la lame basale et présentent des granules de sécrétion. Ces cellules peuvent être isolées ou regroupées sous forme d'îlots innervés, nommés corpuscules neuro-épithéliaux ou NeuroEpithelial Bodies (NEB-1). Elles sont rares, à raison d'une cellule neuroendocrine pour 2 500 cellules épithéliales mais elles restent tout de même présentes au sein de l'épithélium bronchiolaire, notamment au niveau des zones de bifurcation des voies aériennes (Boers *et al.*, 1996). Ces cellules peuvent être mise en évidence par immunohistochimie grâce à leur expression des chromogranines. Les chromogranines sont des protéines solubles retrouvées au sein des grains de sécrétion de ces cellules. Elles représentent un marqueur très spécifique des

cellules neuroendocrines normales et tumorales. Les produits de sécrétion des cellules neuroendocrines contiennent également des amines bioactives et des peptides dont la sérotonine, la calcitonine, le peptide libérant la gastrine (GRP) ou encore la calcitonine gene-related peptide (CGRP). Ces sécrétions sont dirigées vers les cellules adjacentes ou des structures sous-jacentes à la membrane basale.

Les cellules neuroendocrines régulent le tonus vasculaire ainsi que le tonus musculaire du muscle de Reissessen, la sécrétion de mucus ainsi que l'activité ciliaire par l'intermédiaire de leurs produits de sécrétion. Il a également été démontré que les cellules neuroendocrines pulmonaires étaient capables d'amplifier la réponse allergique dans certaines pathologies chroniques comme l'asthme.

2.3. Les cellules de l'épithélium alvéolaire

La cloison interalvéolaire est l'unité fonctionnelle du poumon et se matérialise en une barrière alvéolo-capillaire. L'épithélium alvéolaire est un épithélium pavimenteux simple, composé de deux types de cellules épithéliales que sont les cellules alvéolaires de type I et les cellules alvéolaires de type II, appelées également pneumocytes de type I et de type II. La proportion relative est de 67 cellules de type II pour 40 cellules de type I (Crapo *et al.*, 1982). Les alvéoles contiennent également des macrophages alvéolaires, cellules de la défense immunitaires des poumons. Avec un rapport macrophages-cellules alvéolaires de 1:10, les macrophages constituent une ligne de défense contre les éléments indésirables inhalés en stimulant la phagocytose (Crapo *et al.*, 1982; Hoffman *et al.*, 1987).

2.3.1. Les pneumocytes de type I

Les pneumocytes de type I (PNI) recouvrent plus de 90 % de la surface alvéolaire (Stone *et al.*, 1992). Ce sont de larges cellules, très aplaties, de 50 à 100 μm de diamètre avec un cytoplasme étroit et étendu. Leur noyau fait saillie dans la lumière alvéolaire. Les jonctions serrées que mettent en place les PNI permettent une diffusion passive des gaz tout en rendant l'épithélium alvéolaire assez imperméable aux autres substances. L'ensemble des PNI, la membrane basale et l'endothélium forme la barrière alvéolo-capillaire. Les PNI sont incapables de se diviser. Leur renouvellement, relativement lent (demi-vie de plusieurs semaines) est assuré par les pneumocytes de types II.

2.3.2. Les pneumocytes de type II

Les pneumocytes de type II (PNII) recouvrent environ 7 à 10 % de la surface des alvéoles pulmonaires mais représentent jusqu'à 60 % des cellules épithéliales alvéolaires (Castranova *et al.*, 1988). Ce sont des petites cellules cuboïdes dont la face apicale est bordée de microvillosités. Ces cellules possèdent de nombreuses mitochondries, des corps lamellaires caractéristiques ainsi qu'un réticulum endoplasmique rugueux et un appareil de Golgi très développé de par leur fonction de sécrétion. Les PNII sont les cellules ouvrières des alvéoles : leur particularité est de sécréter continuellement un surfactant en partie apicale via les corps lamellaires (Fehrenbach, 2001). Le surfactant est un tensioactif riche en protéines (10 % de SP-A, B, C et D) et en lipides (90 % de phospholipides) (Goerke, 1998). Cette substance a pour rôle de diminuer la tension de surface alvéolaire. Les PNII assurent les fonctions de synthèse, de stockage et de sécrétion des protéines du surfactant, principalement représentées par les Surfactant Protein (SP-A, -B, -C et -D). Ces protéines sont classées en fonction de leur indice d'hydrophobicité. Les SP-A et SP-D sont des protéines hydrophiles et présentent la capacité de moduler les réponses immunitaires innées et adaptatives (Pastva *et al.*, 2007). À l'inverse, les SP-B et SP-C sont des protéines hydrophobes et sont impliquées dans la réduction des tensions superficielles de la surface alvéolaire, facilitant l'expansion des alvéoles à l'inspiration et leur maintien à l'état ouvert pendant l'expiration. Nogee *et al.* (2004) ont démontré que les gènes codant les protéines du surfactant B et C pouvaient subir des mutations ce qui expliquerait certaines altérations fonctionnelles dans des maladies pulmonaires comme dans le syndrome de détresse respiratoire chez le nouveau-né (Nogee, 2004). Enfin, les PNII sont considérés comme les cellules souches de l'épithélium alvéolaire par leur capacité de prolifération et de différenciation en PNI.

3. Fonctions de l'épithélium des voies aériennes humain

L'épithélium bronchique joue un rôle majeur de défense au travers de diverses fonctions parmi lesquelles une fonction de barrière et une fonction dans les transports ioniques transépithéliaux intimement liés à sa fonction d'orchestration de la clairance mucociliaire.

3.1. Ancrage cellulaire et fonction de barrière épithéliale

La formation d'un épithélium repose sur la capacité des cellules à adhérer à la membrane basale mais également à établir des jonctions entre elles (**Figure 3 ►**). Elles forment ainsi une

structure robuste et cohésive nécessaire pour assurer les fonctions physiologiques qu'elles régulent.

La membrane basale est une matrice extracellulaire spécialisée dans les interactions cellulaires. Elle est retrouvée à l'interface entre le stroma et l'épithélium bronchique. Elle est composée de deux feuillets, la lame basale, couche superficielle d'origine épithéliale et la lame réticulaire, couche profonde d'origine mésenchymateuse.

Les membranes basales sont principalement constituées de collagène (COL4A1, COL4A2), de laminines, de perlecan et de nidogènes (Aumailley *et al.*, 1993). Ces quatre principaux constituants interagissent entre eux afin de constituer une surface fonctionnelle au pôle basal des cellules épithéliales. Les cellules adhèrent à la membrane basale sous-jacente grâce à la formation de complexes protéiques membranaires, dans lesquels se trouvent des intégrines. Les intégrines sont des hétérodimères transmembranaires constitués d'une chaîne α , qui fixe les cations divalents et d'une chaîne β , qui possède un domaine riche en cystéine. Les intégrines interagissent avec des messagers secondaires intracellulaires impliqués dans la migration, la survie, la prolifération et la différenciation cellulaires.

Les cellules basales des voies aériennes établissent en outre des jonctions stables avec la lame basale appelées hémidesmosomes. Les hémidesmosomes sont des complexes multi-protéiques jonctionnels spécialisés qui contribuent à l'ancrage stable des cellules épithéliales sur la lame basale sous-jacente. Ils représentent les liaisons les plus fortes qu'une cellule épithéliale puisse établir avec la matrice extracellulaire. Les hémidesmosomes sont constitués, à la face interne de la membrane plasmique, d'une plaque dense aux électrons connectée aux filaments de cytokératines présents dans le cytoplasme cellulaire. Ces derniers sont liés à la matrice extracellulaire les intégrines transmembranaires $\alpha_6\text{-}\beta_4$.

La fonction barrière de l'épithélium respiratoire est également liée à la présence de jonctions cellulaires permettant des interactions cellules-cellules. Ces jonctions intercellulaires jouent un rôle essentiel dans le maintien d'un tissu puisqu'elles permettent aux cellules de coopérer et d'être plus efficace contre les agressions extérieures. Comme pour les hémidesmosomes, la majorité de ces jonctions est connectée aux filaments du cytosquelette cellulaire. Les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes sont unies par trois types de jonctions intercellulaires constituées de protéines transmembranaires différentes. Parmi ces jonctions se trouvent les jonctions serrées ou *zonula-occludens* qui ceinturent les cellules épithéliales au pôle apical fermant ainsi l'espace intercellulaire. Elles sont composées d'occludine et de claudines formant un complexe avec des immunoglobulines de type JAM

(Junctional Adhesion Molecule) ainsi que des protéines cytoplasmiques ZO-1. La protéine ZO-1, ainsi qu'une protéine adaptatrice nommée la cinguline, assurent l'ancrage entre les molécules de la jonction et les microfilaments d'actine.

On retrouve également des jonctions intermédiaires, ou jonctions d'ancrage ou encore *zonula-adherens*, sous-jacentes aux jonctions serrées. Elles sont composées de glycoprotéines spécifiques de types cadhérine E ou nectines et sont ancrées du côté cytoplasmique par l'intermédiaire d'une plaque dense cytoplasmique. Des protéines adaptatrices comme les α - et β -caténines et les vinculines assurent la jonction entre les cadhérines et les microfilaments d'actine tandis que l'afadine et la ponsine permettent la jonction entre les microfilaments d'actine et les nectines.

Enfin, la cellule possède un dernier type de jonction, les desmosomes. Ils ne sont pas des *zonulas* mais des *macula-adherens*, des zones d'ancrage aux filaments intermédiaires de cytokératine. Ils sont composés de protéines transmembranaires de la superfamille des cadhérines, les desmoglécines et desmocollines. Ces molécules sont en relation avec la plaque desmosomale qui contient en particulier de la plakoglobine et des desmoplakines.

La cellule possède enfin un système de communication entre cellules adjacentes par l'intermédiaire de canaux intercellulaires, les nexus ou jonctions GAP, encore appelés jonctions communicantes. Les jonctions GAP sont formées par l'association de six connexines, formant un héli-canal appelé connexon. Chaque canal intercellulaire est formé par l'aboutement de deux connexons. Les jonctions communicantes permettent le passage direct d'électrolytes et de petites molécules comme des seconds messagers tels que le Ca^{2+} ou l'AMP cyclique. Leur ouverture et fermeture sont contrôlées en fonction du pH, de la concentration en Ca^{2+} ou d'AMP cyclique.

La cohésion structurale de l'épithélium bronchique est finement régulée. Pour exemple, Brézillon *et al.* (1997) ont montré qu'une déplétion en ATP au niveau de l'épithélium bronchique humain induisait une altération marquée des complexes jonctionnels et de la structure du cytosquelette épithélial, concomitant à une perte d'expression du canal CFTR au pôle apical et de la fonction de sécrétion d'ion chlorure par les cellules (Brézillon *et al.*, 1997). Plus récemment, il a été rapporté que la mutation F508del du gène *CFTR* et donc de l'absence du récepteur CFTR à la membrane apicale, était associée à un cytosquelette d'actine désorganisé et à une perméabilité altérée des jonctions serrées (Castellani *et al.*, 2017).

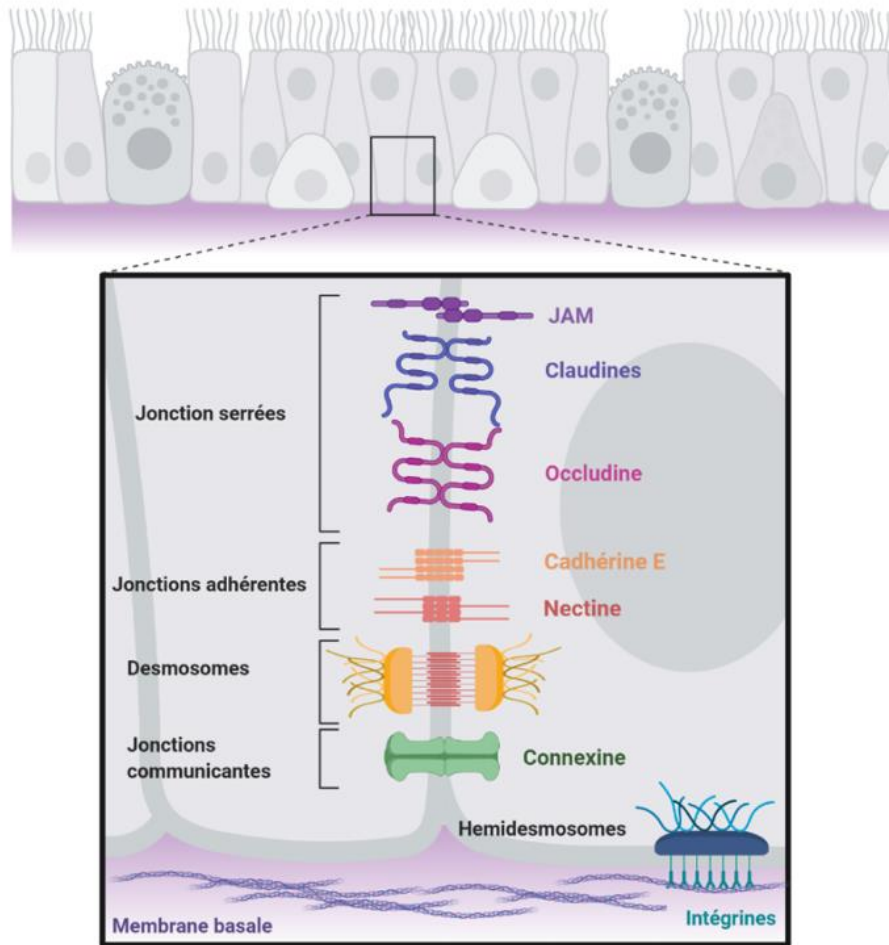


Figure 3: les jonctions cellulaires

3.2. Transports ioniques associés à l'épithélium bronchique

Le transport sélectif d'ions et de molécules, à travers la membrane plasmique permet à la cellule de réguler son environnement interne. Chaque type cellulaire possède des protéines de transport qui lui sont propres. Il existe deux modes de transport d'espèces ioniques, le transport passif et le transport actif. Le transport passif se fait en fonction d'un gradient de concentration, c'est-à-dire du compartiment le plus concentré vers le compartiment le moins concentré. Ce transport concerne soit la diffusion simple de gaz (O_2 , CO_2 , NO) ou de petites molécules apolaires (éthanol, urée) soit la diffusion facilitée, c'est-à-dire que le transport d'espèces ioniques est facilité par une glycoprotéine transmembranaire ou par un complexe macromoléculaire comme les jonctions GAP par exemple. En revanche, le transport actif implique le passage d'une molécule contre son gradient de concentration grâce à des pompes nécessitant de l'énergie sous forme d'ATP. Les échanges ioniques sont également responsables des potentiels de membrane c'est-à-dire des différences de potentiel électrochimique entre le milieu extracellulaire et le compartiment cytoplasmique d'une cellule. Ces potentiels

électrochimiques sont impliqués dans la sécrétion et/ou l'absorption d'eau à travers la membrane épithéliale. Tarran *et al.* (2004) ont démontré que le transport actif d'ions définit la hauteur du liquide de surface des voies respiratoires afin qu'il soit à hauteur des cils : à l'approche de cette hauteur, le taux d'absorption de Na^+ diminue tandis que la sécrétion d'ion Cl^- devient majoritaire, démontrant que les épithéliums des voies respiratoires peuvent réguler le volume de liquide de surface (Tarran, 2004).

L'épithélium bronchique possède de nombreux transporteurs et canaux, parmi lesquels des systèmes de transport du chlore, du sodium et du potassium.

3.2.1. Les canaux chlorure

Les canaux à ions chlorure laissent passer les ions chlorures au travers de la membrane plasmique ou de la membrane des organites intracellulaires. Ces canaux sont anioniques, c'est-à-dire qu'ils assurent la diffusion passive des anions comme les ions Cl^- ou HCO_3^- .

3.2.1.1. Le canal CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*)

La protéine CFTR est le principal canal anionique formant un pore qui permet le passage rapide des ions chlorure Cl^- et bicarbonate HCO_3^- au travers de la membrane plasmique. Le canal CFTR exerce une faible sélectivité pour les anions ce qui lui permet d'effectuer des efflux de différentes espèces anioniques pour lesquelles il est perméable, selon la sélectivité suivante : $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{HCO}_3^- > \text{HCOO}^-$ formate $> \text{F}^- > \text{CH}_3\text{COO}^-$ acétate (Hwang and Kirk, 2013; Linsdell *et al.*, 2000). Le canal CFTR est un régulateur essentiel d'autres canaux chlorure tels que les canaux ORCC et CaCC. Nous reviendrons sur la structure du canal CFTR et ses fonctions associées à la mucoviscidose.

3.2.1.2. Le canal chlorure rectifiant sortant ou ORCC (*Outwardly Rectifying Chloride Channel*)

Le canal ORCC est localisé au niveau de la membrane basolatérale des cellules épithéliales bronchiques humaines. C'est un canal régulé par la concentration en AMPc. Il a été démontré que la protéine CFTR régule le canal ORCC par interactions au niveau membranaire ou cytoplasmique. En effet, la conductance du canal ORCC est régulée par le canal CFTR via les protéines kinases (PKA) (Egan *et al.*, 1992). De plus, lorsque le canal CFTR est fonctionnel, il libère de l'ATP intracellulaire permettant l'activation du canal ORCC (Schwiebert, 1999).

Bien que le canal ORCC soit AMPc/PKA dépendant, son rôle reste encore mal connu. Toutefois, la sécrétion d'ion bicarbonate serait favorisée par l'ouverture du canal ORCC alors que sa fermeture permettrait la sécrétion de chlore (Xia *et al.*, 1997).

3.2.1.3. Les canaux chlorure calcium dépendants (*Calcium dependant Chloride Channels, CaCC*)

Les canaux CaCC sont des canaux à ions Cl^- activés par le calcium avec un seuil d'activation situé entre 0,2 et 5 μM de calcium intracellulaire libre (Agnel *et al.*, 1999). Les canaux CaCC se caractérisent par une séquence de perméabilité anionique selon le gradient de sélectivité suivant : $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$ (Qu and Hartzell, 2000). Les cellules épithéliales des voies aériennes coexpriment le canal CaCC et le canal CFTR au niveau de leurs membranes apicales (Boucher *et al.*, 1989). La régulation de la hauteur du liquide de surface est donc contrôlée à la fois par le canal CFTR et par le canal CaCC. En effet, le canal CFTR contrôle la quantité basale de mucus alors que le canal CaCC agit comme un régulateur de l'épaisseur de la couche muqueuse (Hartzell *et al.*, 2005). De plus, les courants dépendants du canal CaCC sont également activés par l'entrée de calcium extracellulaire, par la libération de calcium du réticulum endoplasmique et par la phosphorylation de la protéine kinase dépendante de la calmoduline : la CaMK II (Ca^{2+} /calmodulin-dépendant protein Kinase II) (Hartzell *et al.*, 2005).

Les récepteurs CFTR, ORCC et CaCC sont les trois principaux canaux à l'origine des flux des ions Cl^- . Il existe cependant d'autres canaux à ions chlorures parmi lesquels nous pouvons évoquer la famille des canaux CIC (Chloride Channel). L'ouverture de ces canaux est non seulement voltage-dépendante mais aussi étroitement régulée par les ions H^+ et Cl^- (Murray *et al.*, 1995). Il existe 9 isoformes de canaux CIC qui diffèrent dans leur distribution tissulaire et leur localisation subcellulaire. Parmi ces CIC se retrouvent le canal CIC-2 situé notamment à la membrane apicale des cellules épithéliales bronchiques (Cid *et al.*, 1995). Certains de ces canaux CIC sont présents à la membrane plasmique et jouent des rôles importants dans la stabilité du potentiel de membrane, la régulation du volume cellulaire ou encore le transport transépithélial. D'autres canaux CIC sont des antiporteurs Cl^-/H^+ , localisés principalement au niveau des vésicules endosomales ou du lysosome, où ils peuvent faciliter l'acidification ou réguler la concentration en ions chlorure (Jentsch, 2008). Nous pouvons également citer les transporteurs $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$ (NKCC). Il s'agit de co-transporteurs neutres des ions Na^+ , K^+ et Cl^- à travers la membrane avec une stœchiométrie de 1 Na^+ : 1 K^+ : 2 Cl^- depuis le milieu

extracellulaire vers le cytoplasme (Haas and Forbush, 2000). Les NKCC sont connus pour jouer un rôle pivot dans le contrôle du volume d'eau cellulaire des cellules polarisées (Gagnon and Di Fulvio, 2013). Ils sont également importants dans la régulation de la sécrétion de fluide par les cellules épithéliales (Russell, 2000).

3.2.2. Les canaux sodiques

Les influx de sodium dans la cellule à partir du milieu extracellulaire se font à travers des protéines transmembranaires comme des canaux voltage-dépendants, des récepteurs-dépendants, des échangeurs ou encore des co-transporteurs (NKCC, voir le Chapitre 3.2.1.3. *Les canaux chlorure calcium dépendants (Calcium dependant Chloride Channels, CaCC)*) En revanche les efflux de sodium contre leur gradient de concentration se font grâce à la pompe Na^+/K^+ -ATPase. Dans cette partie nous aborderons essentiellement le canal ENaC impliqué dans les influx d'ions Na^+ et la pompe Na^+/K^+ -ATPase responsable des efflux d'ions Na^+ .

3.2.2.1. Le Canal Épithélial à Sodium (ENaC-Epithelial Na^+ Channel)

Le canal ENaC est le canal sodique majoritairement présent à la membrane des cellules de l'épithélium respiratoire, depuis l'épithélium nasal jusqu'à l'épithélium alvéolaire. Hautement spécifique des ions Na^+ , ce canal permet l'absorption d'ion Na^+ du liquide de surface vers l'intérieur de la cellule. La protéine ENaC est constituée de trois sous-unités distinctes α , β et γ -ENaC (Canessa *et al.*, 1994). Chaque sous-unité est composée de deux segments transmembranaires, d'une large partie extracellulaire comportant des sites de glycosylation, ainsi que d'une partie intracellulaire formée par les extrémités amino- et carboxy-terminales. Ces extrémités terminales comportent des sites de régulation qui jouent un rôle fondamental dans l'activation et la modulation du canal ENaC. Seule la sous-unité α peut former, à elle seule, des canaux fonctionnels complets (Dagenais *et al.*, 2009). À la naissance, c'est le transport lié à l'activité du canal ENaC qui permet la réabsorption du liquide présent dans les poumons, libérant ainsi l'espace alvéolaire pour les échanges gazeux. Il a été démontré que des souris- α -ENaC^{-/-} ne survivent pas à la naissance car elles sont incapables d'éliminer le liquide pulmonaire (Hummler *et al.*, 1996). Les transports du sodium par l'intermédiaire du canal ENaC peuvent être inhibés par l'amiloride qui se lie rapidement et de manière réversible à la sous-unité α -ENaC, avec une constante de dissociation de l'ordre du micromolaire (Garty and Palmer, 1997). De nombreux modèles d'études montrent que l'activation du canal CFTR est

généralement associée à l'inhibition du canal ENaC. Cette inhibition peut être due à une diminution de la probabilité d'ouverture du canal, qui à son tour peut refléter une diminution d'activation du canal ENaC par protéolyse de ses boucles extracellulaires lorsque le canal CFTR est présent et actif (Rubenstein and Zeitlin, 2000). Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont pas encore totalement connus mais plusieurs hypothèses sont émises. L'inhibition pourrait être due à l'activité propre du canal CFTR car la fonction du canal ENaC semble être régulée par la concentration en Cl^- intracellulaire (König *et al.*, 2001). Une interaction physique a aussi été démontrée par co-immunoprécipitation entre le canal CFTR et le canal ENaC, cette interaction empêchant l'endoprotéolyse de ENaC nécessaire à son activation. Le clivage protéolytique limitant du canal ENaC apparaît comme un mécanisme par lequel CFTR régule, à la baisse et indirectement, l'absorption d'ion Na^+ (Gentzsch *et al.*, 2010). Enfin, une étude plus récente basée sur un modèle mathématique émet l'hypothèse que le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ($\text{PI}(4,5)\text{P}_2$) protège le canal ENaC de l'ubiquitination. Selon ce modèle, la hauteur du liquide de surface pourrait également être sensible aux variations du $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, de par son possible rôle sur la présence du canal ENaC à la membrane, ce qui placerait le $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ comme une future approche thérapeutique (Oliveira *et al.*, 2019).

3.2.2.2. La pompe Na^+/K^+ -ATPase

La sortie du sodium hors de la cellule est assurée par la pompe Na^+/K^+ -ATPase localisée au niveau de la membrane basolatérale des cellules épithéliales bronchiques. La concentration en potassium intracellulaire est d'environ 160 mM tandis que la concentration en potassium extracellulaire est de 4 mM. De plus, la concentration intracellulaire en ions Na^+ est d'environ 10 mM alors que la concentration extracellulaire en ions Na^+ est de 144 mM. Ces différences sont engendrées et maintenues par une enzyme ATPase de la membrane plasmique, mettant en évidence un transport actif primaire des ions K^+ et Na^+ contre leur gradient électrochimique. Cette enzyme est constituée de 3 sous-unités α , β et γ étroitement liées. La pompe Na^+/K^+ -ATPase fait sortir trois ions Na^+ et fait entrer deux ions K^+ nécessitant l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par l'activation de l'enzyme suite à la phosphorylation transitoire de l'aspartate Asp. De plus, le déséquilibre des charges crée par cette activité enzymatique induit une différence de potentiel membranaire favorisant l'absorption continue de sodium à la surface apicale des cellules par le canal ENaC.

Au total, le transport transépithélial du sodium est donc le moteur permettant la réabsorption du liquide de surface de l'épithélium respiratoire.

3.2.3. Les canaux potassiques

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis en 1987 de cloner le gène *shaker* et ainsi d'identifier le premier canal potassique chez la drosophile. Depuis, l'équipe du Pr. Brochiero a réalisé un arbre phylogénique des canaux potassiques détectés dans les cellules épithéliales des voies aériennes et alvéolaires (Bardou *et al.*, 2009). Les alignements de séquences en acide aminés ont permis de classer les canaux potassiques en 3 catégories : les canaux potassiques à six segments transmembranaires (STM), les canaux à quatre STM et enfin, les canaux à deux STM. Dans le chapitre précédent, nous avons présenté l'importance de l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase qui génère la principale force motrice pour ces transports en assurant la sortie de Na^+ en échange de l'entrée de K^+ dans la cellule. Dans ce contexte, les canaux potassiques assurent deux fonctions principales : le maintien du potentiel de membrane et le recyclage basolatéral du potassium qui garantit ainsi le maintien des gradients électrochimiques.

Au sein des canaux à six STM se trouvent les canaux voltage-dépendant Kv parmi lesquels le canal KvLQT1. Ce canal potassique a été découvert en 1996 car ses mutations sont associées aux troubles du rythme cardiaque, le syndrome du QT long congénital (Wang *et al.*, 1996). KvLQT1 est exprimé par les cellules épithéliales des voies aériennes et alvéolaires. Ce canal participe au courant de potassium basolatéral qui peut être mesuré en chambre de Ussing en présence ou absence d'inhibiteurs tel que le clofilium (Cowley and Linsdell, 2002). Bardou *et al.* ont démontré, en 2012, que le canal KvLQT1 en association avec le canal K_{ATP} (ATP-dépendant K^+ channel) exercent un contrôle soutenu du transport d'ions Na^+ par la régulation du canal ENaC dans les cellules alvéolaires de type II (Bardou *et al.*, 2012). Cette même association, stimulée par l'activation autocrine du récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) serait impliquée dans le processus de réparation de l'épithélium alvéolaire (Trinh *et al.*, 2007).

Le canal ROMK (Renal Outer Medullar K), appartenant à la catégorie des canaux K^+ à deux STM, forme un unique pore et appartient à la famille des canaux Kir. Il participe au recyclage et à la sécrétion des ions K^+ . De par sa localisation, c'est un canal qui est régulé par le canal CFTR, en raison de sa sensibilité à l'ATP (Lu *et al.*, 2006).

Enfin, comme cité précédemment, le potassium est également transporté via le co-transporteur NKCC.

Les transports ioniques sont indispensables au maintien de l'homéostasie de l'épithélium respiratoire. Les balances ioniques sont nécessaires au maintien du gradient électrochimique, entre la face interne et la face externe des cellules épithéliales. Ces échanges ioniques participent également au maintien de l'hydratation de l'épithélium et de la hauteur du liquide de surface ainsi qu'aux fonctions de protection de l'épithélium respiratoire, contre les multiples agents pathogènes. Parmi les mécanismes de défense que possède l'épithélium respiratoire, la clairance mucociliaire reste un acteur essentiel de la protection pulmonaire.

3.3. La clairance mucociliaire

L'épithélium respiratoire est recouvert d'un mucus qui piège les particules inhalées et xénobiotiques pouvant le léser pour les évacuer en dehors des voies aériennes par le battement coordonné des cils présents au pôle apical des cellules ciliées. Ce mécanisme, appelé « clairance mucociliaire », permet de remonter le mucus des voies aériennes les plus distales vers la trachée. Ensuite, le pharynx dirige le mucus soit vers les voies digestives par déglutition, soit l'élimine des voies aériennes supérieures par la toux (Zahm *et al.*, 1989). C'est un système de défense inné du poumon. La clairance mucociliaire dépend de trois éléments essentiels à son fonctionnement : la sécrétion de mucines, la hauteur du liquide de surface ou ASL (Airways Surface Liquid) et en particulier du liquide périciliaire, et le battement ciliaire (**Figure 4 ►**) (Davis and Lazarowski, 2008). L'ASL est constitué de deux phases : la phase gel représentée par le mucus qui repose sur une phase sol aussi appelée le liquide périciliaire. L'épithélium joue donc un rôle central dans la clairance mucociliaire à plusieurs titres : ce sont les cellules épithéliales qui produisent les mucines du mucus. Ce sont également les cellules de l'épithélium, plus précisément les cellules ciliées, qui vont mouvoir le mucus. Enfin, par son rôle dans les transports des ions et d'eau, l'épithélium régule la hauteur du liquide de surface à travers sa composition en électrolytes et de son degré d'hydratation.

3.3.1. Le liquide périciliaire

Le liquide périciliaire est un fluide aqueux d'une épaisseur d'environ 7 μm , de faible viscosité, aux propriétés lubrifiantes, et dans lequel baignent les cils. Il résulte des mouvements d'eau régulés par les flux transépithéliaux des ions Na^+ absorbés et des ions Cl^- sécrétés. Par conséquent, l'épaisseur de cette phase aqueuse et sa composition en ions sont cruciales pour l'efficacité du transport mucociliaire. Pour obtenir un transport du mucus et une protection

efficace de l'épithélium bronchique, des mécanismes de régulation sont mis en jeu pour contrôler l'épaisseur et la viscosité du liquide périciliaire (Tarran, 2004). En effet, une faible épaisseur de la phase sol empêche le bon mouvement des cils qui se retrouvent comprimés par le mucus, tandis qu'une hauteur trop importante ne permet pas d'avoir une jonction cils-mucus optimale pour une clairance mucociliaire efficace. Le liquide périciliaire contient également des protéines solubles qui participent activement à la protection des voies respiratoires. Ces protéines possèdent des activités anti-oxydantes, anti-protéasiques et anti-bactériennes (Bals and Hiemstra, 2004). Parmi ces molécules se trouve le lysozyme dont l'action participe à la destruction du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Les anti-leucoprotéases ou encore l' α 1-antitrypsine sont des inhibiteurs de protéases sécrétés dans le liquide périciliaire et qui concourent au maintien de l'intégrité de la muqueuse bronchique. La plus importante anti-leucoprotéase, le SLPI (Secretory Leukocyte Protease Inhibitor), est une sérine-protéase avec une constante d'association très élevée vis-à-vis de l'élastase leucocytaire. Parmi les molécules aux propriétés anti-oxydantes se retrouvent le glutathion, la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (Cantin *et al.*, 1990). Pour exemple, le glutathion est un tripeptide formé par l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. C'est un agent antioxydant et de détoxification via sa propriété d'oxydoréduction. Présent sous une forme réduite ou sous une forme oxygénée, il protège notamment les cellules épithéliales contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS- Reactive Oxygen Species) ou encore les xénobiotiques comme les métaux tels que le cuivre, le zinc ou encore le plomb (Freedman *et al.*, 1989; Spitz *et al.*, 1995).

3.3.2. *Le mucus*

Le mucus est produit et sécrété par les cellules caliciformes de l'épithélium de surface bronchique et les cellules sécrétrices des glandes séro-muqueuses sous-épithéliales. Le mucus correspond à la phase « gel » du liquide de surface. Sa composition lui permet d'être doté de propriétés rhéologiques qui facilitent le piégeage de particules étrangères, ainsi que leur transport mucociliaire en vue de leur élimination (Puchelle *et al.*, 1983). Le mucus est composé de 95 % d'eau, de 2 à 3 % de protéines et de glycoprotéines, de 1 % de lipides et de 1 % de minéraux et d'ions. La rhéologie est une science de la matière en écoulement et lorsqu'elle est appliquée au mucus, elle représente l'état physique des sécrétions broncho-pulmonaires. Il est possible de caractériser le mucus par sa viscosité, son élasticité ou encore sa filance, qui modulent le transport mucociliaire par le battement des cils, ou encore ses propriétés d'adhésivité et de mouillabilité qui modulent l'interface entre le mucus et l'épithélium des voies

aériennes (Zahm *et al.*, 1989). Une visco-élasticité anormale du mucus est reliée à la surproduction de glycoprotéines de types mucines et à l'hypersécrétion, caractéristiques courantes de pathologies respiratoires inflammatoires chroniques.

Les mucines appartiennent à une famille hétérogène de glycoprotéines de haut poids moléculaire (250 et 30 000 kDa). Elles sont formées d'un squelette peptidique nommé apomucine et de chaînes glucidiques reliées au squelette par des liaisons O-glycosidiques majoritaires ou N-glycosidiques. Les glycosylations confèrent aux mucines une forte densité et une grande viscosité. Ces enchevêtrements représentent de véritables pièges pour les bactéries. Chez l'Homme, les mucines sont soit adressées à la membrane plasmique (mucines membranaires), soit sécrétées dans le milieu environnant (mucines sécrétées).

Il existe de nombreuses mucines membranaires parmi lesquelles nous pouvons citer l'exemple de la mucine 1 (MUC1), exprimée et présentée à la membrane par les cellules de l'épithélium bronchique. Ces mucines sont membranaires par la présence d'un domaine glycoprotéique transmembranaire, mais elles restent tout de même présentes dans le mucus. Les mucines membranaires sont plutôt associées à des fonctions de régulation. Zhang *et al.* (2019) ont décrit, dans le modèle de lignée cellulaire bronchique 16HBE14o⁻, que la régulation négative de MUC1 pourrait contribuer à la résistance des cellules aux traitements par des glucocorticoïdes (Zhang *et al.*, 2019). Dans le modèle de lignée cellulaire bronchique cancéreuse A549, MUC1 peut également être régulé par des médiateurs de l'inflammation tel que le TNF- α ou la dexaméthasone (Xu and Wang, 2017).

Les mucines sécrétées, quant à elles, participent entièrement à la formation du réseau tridimensionnel du mucus. Au sein des voies aériennes, les mucines sécrétées sont majoritairement représentées par la mucine MUC5AC, sécrétée par les cellules caliciformes et la mucine MUC5B, sécrétée majoritairement par les cellules des glandes sero-muqueuses. La mucine MUC5AC est la mucine majoritaire du tractus trachéo-bronchique. Son organisation structurale est complètement connue tandis que la régulation de son expression reste partiellement à déterminer. Il a été démontré que les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie Gram-négative, entraînent une surexpression de MUC5AC pouvant aller jusqu'à vingt fois son expression initiale, via l'activation du récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Kohri *et al.*, 2002).

3.3.3. Le battement ciliaire

L'expulsion du mucus hors des voies aériennes nécessite un acteur supplémentaire et non négligeable à la fonction de clairance mucociliaire, les cils. La mise en place des cils ou

ciliogénèse, se fait au cours du développement et lors du renouvellement des cellules ciliées. Les cils sont mobiles et se situent à la surface apicale des cellules ciliées (*voir Chapitre 1- 2.1.2. Les cellules ciliées*). Ce sont des extensions cellulaires spécialisées, d'un diamètre de 0,3 µm. Sur une coupe transversale, l'observation microscopique des cils moteurs montre la présence d'un axonème de neuf doublets de microtubules périphériques disposés en anneau, autour d'une paire centrale de microtubules. Les doublets de microtubules sont composés d'un microtubule A de treize protofilaments et un microtubule B incomplet de dix à douze protofilaments. Les doublets de microtubules, reliés les uns aux autres par des ponts de nexine, et présentant des bras de dynéine, sont ancrés dans le cytoplasme des cellules au niveau de corps basaux ciliaires. Cette organisation structurale leur confère un arrangement « 9 + 2 ». Les battements ciliaires se font par le déplacement des bras de dynéine se traduisant par le glissement des microtubules périphériques les uns contre les autres (Moore *et al.*, 2004). Ce mécanisme est dépendant de l'hydrolyse d'ATP (Wanner *et al.*, 1996). Les extrémités distales des cils entrent en contact avec le mucus sur une profondeur de 0,5 µm à une vitesse de 800 µm/sec pour une clairance mucociliaire optimale. Les cils moteurs présentent deux mouvements : une phase active de battement de propulsion de courte durée suivie d'une phase passive de retour à l'état initial, plus longue, au cours de laquelle les cils vont se replier dans le liquide péri-ciliaire selon un mouvement de rotation (Sears *et al.*, 2013).

La clairance mucociliaire est un mécanisme de protection de l'épithélium bronchique. Son dysfonctionnement ou sa dérégulation entraînent, en particulier, la persistance des infections respiratoires. Dans la mucoviscidose, maladie génétique rare, l'altération de la clairance mucociliaire due au dysfonctionnement du canal CFTR, entraîne une déshydratation importante du mucus s'accompagnant d'obstructions bronchiques sévères et d'infections respiratoires qui deviennent chroniques (Cuthbert, 1991). La réponse du système immunitaire se fait par la mise en place d'une première ligne de défense, l'inflammation. Dans la prochaine partie de cette introduction de thèse, nous allons présenter la mucoviscidose, maladie génétique autosomique récessive et l'inflammation bronchique associée au dérèglement du canal CFTR.

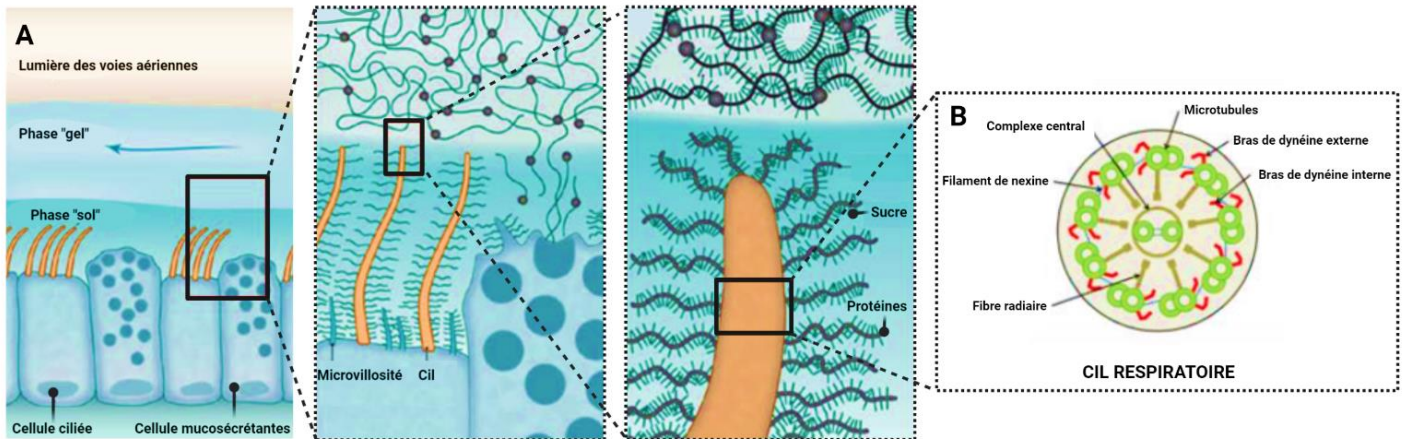


Figure 4: la clairance mucociliaire (d'après Dickey, 2012)

A : La couche de mucus se déplace sur une couche périciliaire immobile de plus grande densité. Les cellules sécrétrices synthétisent les mucines polymères qui forment la phase « gel » mobile, tandis que les cellules ciliées propulsent le gel. Un réseau dense de mucines et de mucopolysaccharides membranaires recouvre les surfaces épithéliales des voies respiratoires. Les chaînes latérales des sucres, très denses, font prendre aux mucines membranaires une configuration partiellement étendue, tandis que les polymères de mucine dans la couche de gel sont des bobines aléatoires enchevêtrées. B : organisation du cil respiratoire.

CHAPITRE 2 : LA MUCOVISCIDOSE

Chapitre 2: La Mucoviscidose

1. Epidémiologie de la mucoviscidose

La mucoviscidose (CF pour Cystic Fibrosis) est la plus fréquente des maladies génétiques héréditaires graves dans la population caucasienne. La surveillance épidémiologique de la population atteinte de CF en France repose sur une étroite collaboration entre l'association Vaincre la Mucoviscidose et l'Institut National d'Etudes démographiques (INED) qui établissent le registre français de la CF. En 2020, le registre recense 7376 patients avec une répartition de 40,3 % d'enfants (2909 enfants) pour 59,7 % d'adultes (4307 adultes). Parmi l'ensemble de ces patients, 14,6 % des patients ont un âge supérieur à 40 ans (1056 sur 7376 patients), contre 5,6 % en 2009 (<https://www.vaincrelamuco.org/2019/05/17/statistiques-et-publications-204>). Les hommes et les femmes sont atteints avec la même fréquence par la maladie (Stephenson *et al.*, 2017).

Les avancées de la recherche sur la CF ont permis d'améliorer l'espérance de vie des patients. La prévalence de la CF diffère selon la région, le pays, la population et l'origine ethnique. En France, la prévalence est estimée à 10,8 malades pour 100 000 habitants. Toutefois, elle demeure très variable en fonction des régions françaises où elle peut atteindre 12,5 à 18 malades pour 100 000 habitants dans les départements comme la Marne, le Pas-de-Calais ou le Finistère. Elle est également élevée dans des régions plus isolées comme les départements d'outre-mer, en particulier l'île de la Réunion (**Figure 5 ►**). L'incidence de la CF en France est estimée à 1 naissance sur 4 500 soit environ 200 enfants atteints de la CF naissant chaque année. De plus, il est estimé qu'environ deux millions de personnes sont, sans le savoir, porteurs sains d'une mutation du gène *CFTR* responsable de la transmission de la CF en France soit 1 personne sur 35.

L'espérance de vie est estimée à environ 40 ans en moyenne pour les patients CF grâce aux progrès dans la prise en charge et le suivi de la maladie ainsi qu'à l'amélioration des traitements. Malgré les innovations réalisées, la CF reste une maladie mortelle avec, en 2020, le décès de 45 malades. Ce résultat permet d'observer une diminution importante de la mortalité, en comparaison de à l'année 2009, avec 67 décès pour un nombre total de patients moins important qu'en 2020.

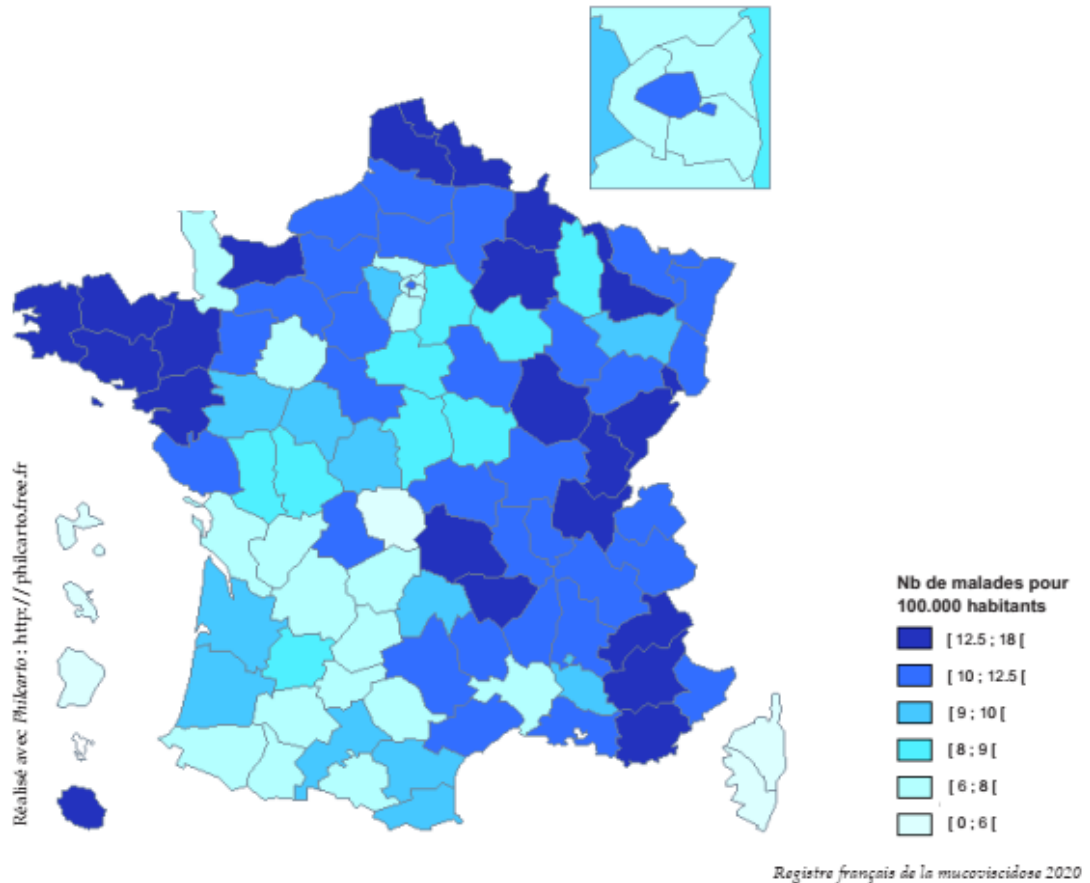


Figure 5: prévalence de la CF par département (nombre de patients pour 100 000 habitants).
Registre de la mucoviscidose 2020.

2. CFTR

La CF est liée à la mutation du gène codant la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). En 1985, le Professeur Tsui et son équipe ont découvert un marqueur génétique de la maladie sur le chromosome 7 avec une précision d'environ 30 000 000 paires de bases grâce à la mise en place de la stratégie de clonage positionnel (Tsui *et al.*, 1985). En 1989, les équipes du Professeur Tsui, du Professeur Riordan et du Docteur Collins ont déterminé la localisation précise du locus du gène *CFTR* ainsi que la mutation à l'origine de la pathologie (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Tsui *et al.*, 1985).

2.1. Du gène *CFTR* à la protéine CFTR

Le gène *CFTR* est localisé sur le bras long du chromosome 7 au locus 7q31.2. Il a une taille de 180 kilo paire de bases (kpb) comprenant 27 exons. La transcription du gène *CFTR* sous forme d'un Acide RiboNucléique messager (ARNm) lui permet d'atteindre une taille de

6,5 kilobases (kb) (Rowntree and Harris, 2003). Cet ARNm sera maturé en une séquence codante de 4,4 kb et code la protéine transmembranaire CFTR, constituée de 1 480 acides aminés pour une taille de 170 kiloDaltons (kDa).

Cette protéine est un canal anionique de faible conductance (6-10 picoSiemens, pS) (Sheppard and Welsh, 1999) appartenant à la famille des transporteurs Adénosine-5'-TriPhosphate-Binding Cassette (ABC). Elle favorise le transport actif d'ions par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP comme source d'énergie. La topologie de la protéines CFTR décrit une structure tridimensionnelle de motif en hélice constituée de 5 domaines distincts. Deux domaines transmembranaires TMD1 et TMD2 comprenant chacun six hélices α hydrophobes, permettent la formation du pore du canal ainsi que la sélectivité anionique (**Figure 6 ►**). Ces caractéristiques reposent sur dix des douze hélices α contenant un ou plusieurs acides aminés chargés positivement favorisant en conséquence le passage d'ions chargés négativement (Hwang and Kirk, 2013). Les domaines TMD sont surmontés par deux domaines intracellulaires appelés Nucleotide Binding Domain-1 et -2 (NBD1 et NBD2). Ces domaines hydrophiles sont formés d'un feuillet β entouré d'hélices α , et contiennent des séquences consensus de liaison à l'ATP participant à la régulation des mécanismes ATP-dépendants d'ouverture et de fermeture du canal. Enfin, le domaine Regulatory Domain (RD), cytoplasmique et spécifique de CFTR, relie les deux séquences répétées TMD-NBD. Ce domaine présente de nombreuses charges positives et négatives liées à la présence de nombreux acides aminés basiques (K, lysine ; R, arginine ; H, histidine) et acides (D, acide aspartique ; E, acide glutamique), respectivement. Le RD possède de multiples séquences consensus riches en sérines/thréonines nécessaires à la phosphorylation/activation de CFTR par la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC). La phosphorylation de la PKA et de la PKC, dépendante de l'ATP et de l'AMPc, induit des modifications de la conformation de la protéine CFTR, permettant ainsi la conductance des anions à travers le pore (Riordan *et al.*, 1989; Anderson *et al.*, 1991; Collins, 1992; Chappe *et al.*, 2003; Saint-Criq and Gray, 2017). Récemment, l'utilisation de la cryomicroscopie électronique a permis de décrire deux conformations de la protéine CFTR. Lorsque la protéines CFTR est liée à l'ATP, elle devient phosphorylée et représente la conformation « ATP-bound » à l'inverse de la conformation « ATP-free » où la protéine est déphosphorylée sans liaison à l'ATP (Zhang *et al.*, 2018).

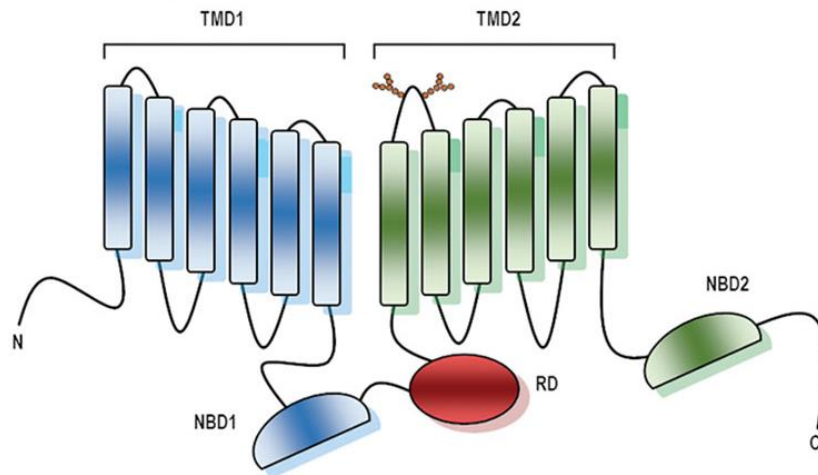


Figure 6: la protéine CFTR (Lopes-Pacheco, 2019)

2.2. Biosynthèse et dégradation de CFTR

Dans le réticulum endoplasmique (RE) a lieu l'addition co-translationnelle d'un oligosaccharide sur la chaîne peptidique de CFTR en cours de synthèse. Cette addition, appelée N-glycosylation, se fait sur le groupement NH_2 d'un résidu asparagine. Pour la protéine CFTR, il existe uniquement deux sites consensus de N-glycosylation sur les asparagines 894 et 900 de la 4^{ème} boucle extracellulaire de CFTR. L'oligosaccharide précurseur, une unité de 14 résidus glucidiques comprenant 2 N-acétylglucosamines (GlcNAc), 9 mannoses et 3 glucoses, est greffée à la chaîne polypeptidique naissante par l'oligosaccharyltransférase. Puis, les deux glucoses terminaux sont immédiatement enlevés par l' α 1,3-glucosidase II et l' α 1,2-glucosidase I. La protéine monoglycosylée, appelée « core-glycosylé », est reconnue par la calnexine qui favorise son repliement. Après un laps de temps durant lequel la protéine a atteint un certain degré de repliement, le glucose restant est éliminé par l' α 1,3-glucosidase II. La protéine CFTR se sépare de la calnexine et devient apte à être transportée vers l'appareil de Golgi (Zhang *et al.*, 1998).

La maturation de la protéine CFTR se poursuit dans les compartiments du Golgi et se traduit par une augmentation de son poids moléculaire de 20 kDa. Ces modifications enzymatiques favorisent la maturation des glycanes N-liés, lui donnant ainsi sa forme hautement glycosylée. La protéine CFTR devient alors mature et est appelée forme « complexe-glycosylée ». Cette dernière alors couplée à la membrane des vésicules trans-golgiennes, est dirigée vers la membrane plasmique. Par fusion membranaire, la protéine CFTR est présente à

la membrane plasmique des cellules épithéliales ou présente dans une réserve subapicale de protéines qui pourra être soit recyclée, soit envoyée vers la voie de dégradation lysosomale.

Durant sa biosynthèse, la protéine CFTR existe donc sous au moins quatre formes de glycosylation différentes, qui sont nommées : forme A, forme B, forme B' et forme C (Cheng *et al.*, 1990; Lukacs *et al.*, 1994; Ward and Kopito, 1994). La forme A correspond au précurseur non glycosylé de CFTR sortant du ribosome dont le poids moléculaire avoisine les 130 kDa. Ce précurseur est rapidement glycosylé au niveau des résidus N894 et N900, pour donner la forme B « core-glycosylée » de 140 kDa (Kowarik *et al.*, 2002; Lukacs *et al.*, 1994). Cette molécule contient une chaîne d'oligosaccharides très riche en mannose, ce qui la rend sensible à l'endoglycosidase H (endo H) (Ward and Kopito, 1994). A la fin du processus, 70% de la forme B de la protéine CFTR sauvage sont rapidement dégradés par une voie de dégradation mal identifiée avec une demi-vie de 20 à 40 minutes (Lukacs *et al.*, 1994). Les 30 % restant, dénommés forme B', passent par une étape de maturation ATP-dépendante qui leur confère une résistance aux protéases. Au niveau du Golgi, la forme B' subit une maturation donnant ainsi naissance à la forme C, protéine hautement glycosylée de 170 kDa résistante à l'endo H, qui s'insérera dans la membrane plasmique (Kopito, 1999) (**Figure 7 ▼**).

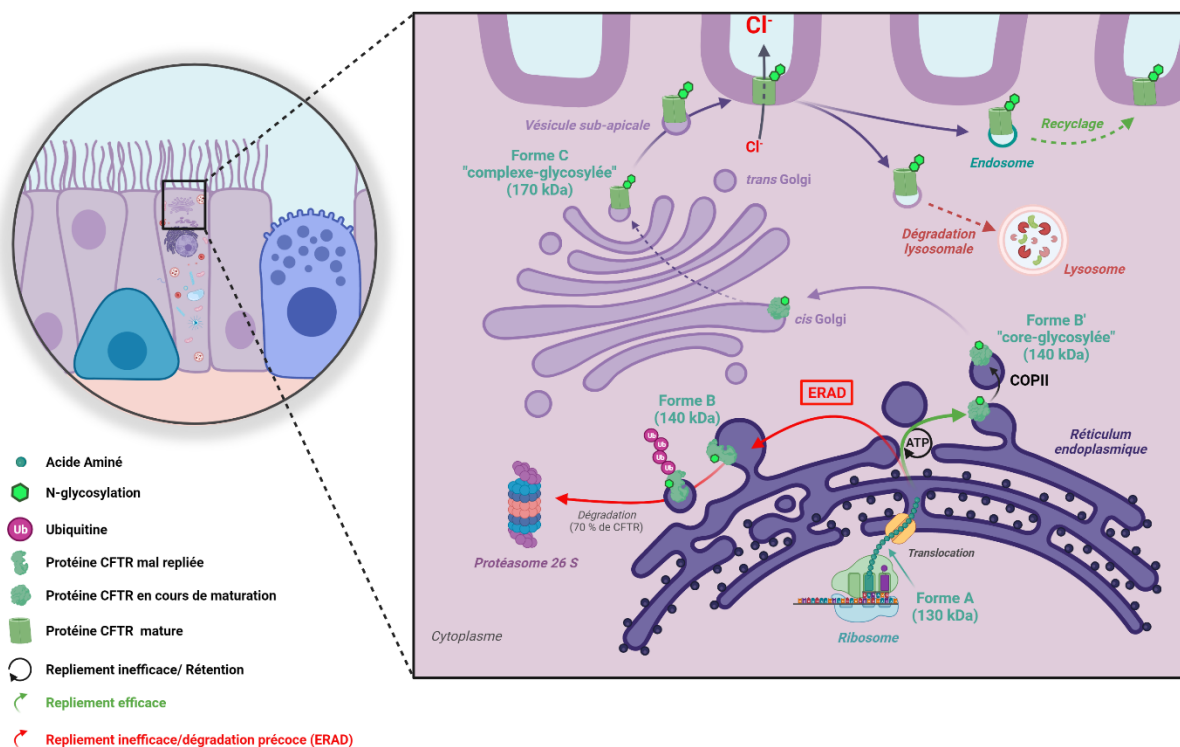


Figure 7: biosynthèse et dégradation de la protéine CFTR (modifiée d'après Cheng *et al.*, 1990 ; Lukacs *et al.*, 1994 ; Ward et Kopito, 1994).

2.3. Localisation de CFTR

L'expression de la protéine CFTR est associée aux cellules épithéliales des organes à glandes exocrines tels que le pancréas, les glandes salivaires, les poumons, le foie, les intestins, la peau et les appareils génitaux (Crawford *et al.*, 1991). Une analyse *in silico* des ensembles de données sur l'expression génique globale du projet Genotype-Tissue Expression (GTEx) d'environ 1000 individus, confirme que CFTR est abondamment exprimé dans plusieurs tissus avec une expression majoritaire au sein de l'épithélium des glandes salivaires et pancréatiques. L'expression de CFTR au niveau des poumons reste faible même si son absence est à l'origine de la grande majorité de la morbidité et de la mortalité dans la CF (Ideozu *et al.*, 2019). De plus, il reste évident que les mutations affectant l'expression et l'efficacité du canal CFTR ont des conséquences multisystémiques par sa présence dans de nombreux organes, même à plus faible échelle, comme au niveau du cerveau ou encore la thyroïde (**Figure 8 ▼**). A l'échelle cellulaire au niveau pulmonaire, CFTR est exprimé tout le long de l'arbre bronchique avec une variabilité topique inter-patient. Une cartographie complète des épithéliums pulmonaires par séquençage génomique de cellule unique (Single-cell Genomic Sequencing) a permis de redéfinir l'ensemble des types cellulaires chez l'Homme.

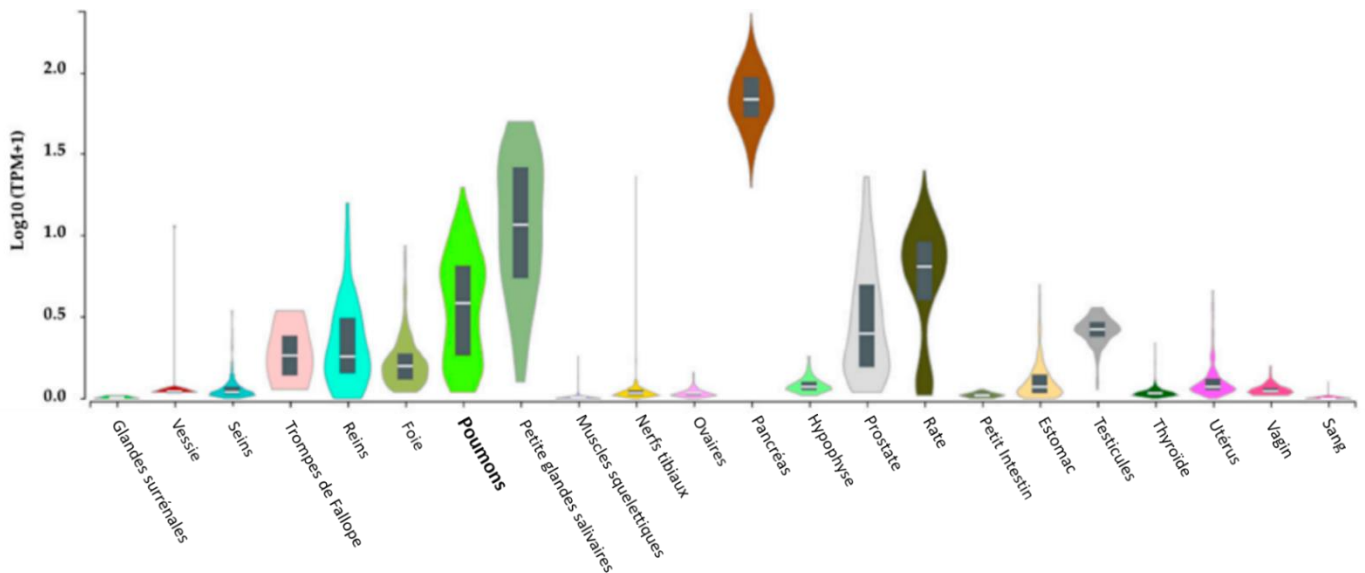


Figure 8: expression globale de la protéine CFTR humaine sauvage (modifiée d'après Ideozu *et al.*, 2019).

Parmi ces cellules se trouvent deux nouveaux types cellulaires, les cellules deuterosomales et les ionocytes, en plus des cellules basales / suprabasales, des cellules ciliées et des cellules sécrétrices déjà identifiées. Les ionocytes contiennent une grande proportion de

CFTR et font de ces cellules très particulières, une nouvelle opportunité pour corriger le fonctionnement de CFTR défectueux. En outre, la protéine CFTR est présente au sein des cellules séreuses des glandes sous muqueuses comme dans les cellules ciliées de l'épithélium de surface (Delavoie *et al.*, 2009; Jacquot *et al.*, 1993). Cependant, CFTR reste plus important dans les glandes sous muqueuses que dans l'épithélium de surface. L'expression de CFTR a également été comparée entre les bronches et les bronchioles par single-cell RNAseq (Okuda *et al.*, 2021). Aucune différence d'expression de CFTR n'a été remarquée entre ces deux localisations. En revanche, en plus de sa présence au sein des cellules ciliées et des ionocytes, CFTR est également exprimé par les cellules sécrétrices de l'épithélium de surface à des pourcentages différents entre les bronches et les bronchioles, respectivement 22,1 % contre 41,1 % (Engelhardt *et al.*, 1994; Okuda *et al.*, 2021). A l'inverse, l'expression de CFTR des cellules suprabasales au niveau des bronches reste supérieure à celle des cellules des bronchioles, respectivement 27,1 % contre 9,8 % (**Figure 9 ▼**).

A l'échelle sub-cellulaire, la protéine CFTR sauvage est localisée au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales des voies aériennes (Capurro *et al.*, 2021; Cheng *et al.*, 1990). CFTR est également distribué dans le cytoplasme cellulaire, au niveau sous-apical et péri-nucléaire (Dalemans *et al.*, 1992; Puchelle *et al.*, 1992). De plus, CFTR peut être présent à la membrane du réticulum endoplasmique (Pasyk and Foskett, 1995) dans les endosomes (Lukacs *et al.*, 1992), dans le lysosome (Barasch *et al.*, 1991) et au niveau des granules sécrétoires (Delavoie *et al.*, 2009).

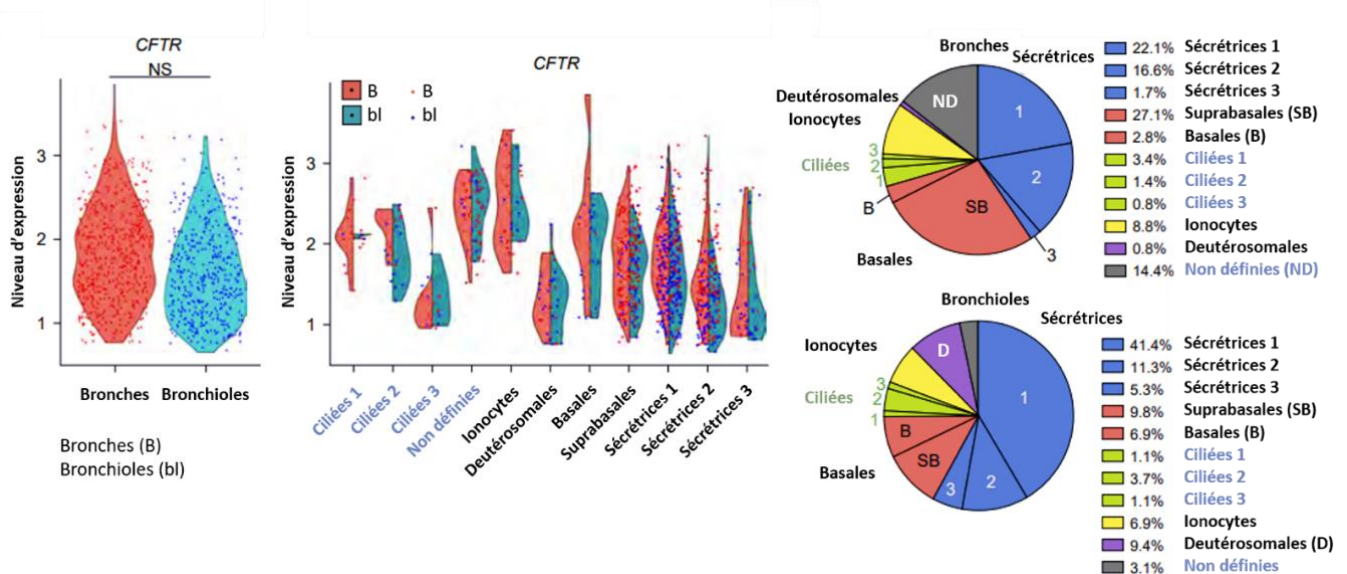


Figure 9: caractérisation des cellules épithéliales CFTR positives au sein des bronches et des bronchioles humaines saines (modifiée d'après Okuda *et al.*, 2021)

Toutefois sa localisation peut être altérée de manière mutation-dépendante dans la CF. Pour exemple, en présence d'une mutation F508del homozygote, le défaut de maturation de la forme B du canal CFTR empêche son acheminement vers la membrane. Ainsi sa localisation reste cytoplasmique, soit au niveau du réticulum endoplasmique, soit en cours de dégradation par le protéasome 26S. L'analyse par western-blot permet également de se rendre compte de l'absence de maturation post-traductionnelle normalement définitive de la protéine CFTR mutée au niveau de l'appareil de Golgi. En effet, CFTR conserve une taille de 150 kDa pour la forme mutée alors qu'à terme la forme C est capable d'avoir un poids supérieur à 170 kDa (Kreda *et al.*, 2005) (**Figure 10 ▼**).

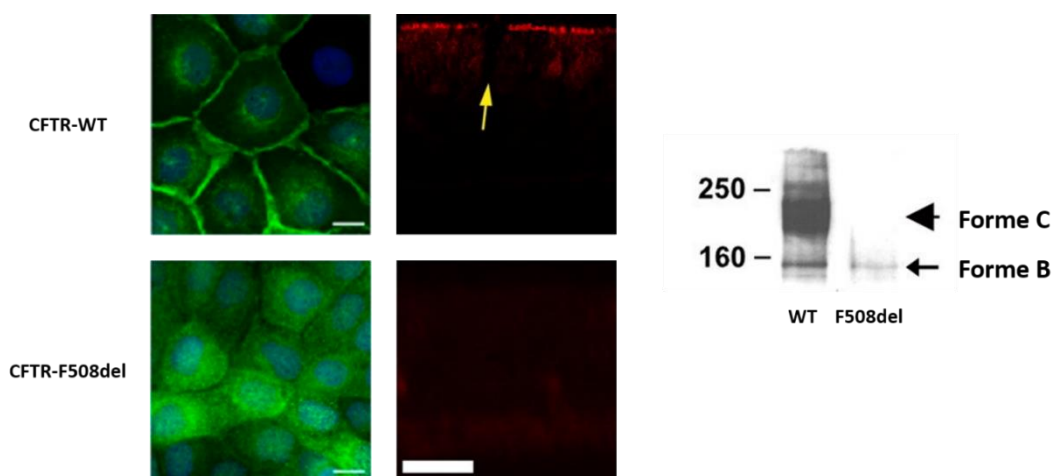


Figure 10: localisation de la protéine CFTR sauvage versus F508del homozygote.

A : immunocytochimie des protéines CFTR sauvages versus F508del homozygote (en vert) exprimées par les cellules CFBE41o-, barre : 15 μ m. B : expression des protéines CFTR sauvages (WT) versus F508del homozygote (en rouge) des cellules épithéliales bronchiques primaires en culture en interface air-liquide, la flèche jaune montre la présence d'une cellule non ciliée, barre : 20 μ m). C : western-blot anti-CFTR des protéines CFTR normal versus F508del homozygote issues de culture de cellules bronchique humaine (images modifiées issues du travail de Kreda *et al.*, 2005 et de Capurro *et al.*, 2021).

2.4. Régulation du canal CFTR

Au repos, le canal CFTR est inactif et en conformation fermée C₀. L'activation de l'adénylate cyclase convertit l'ATP en AMP cyclique (AMPc) ce qui engendre une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc. D'un point de vue expérimental, l'utilisation de la forskoline comme intermédiaire pharmacologique à l'activation de l'adénylate cyclase permet d'étudier le canal CFTR, que ce soit *ex vivo* ou *in vitro*. Ainsi,

l'augmentation intracellulaire de l'AMPc entraîne l'activation de la PKA. C'est l'une des kinases la mieux caractérisée dans l'étude du canal CFTR (Cheng *et al.*, 1991; Gadsby and Nairn, 1999) mais ce mécanisme peut également être considéré pour la PKC (Chappe *et al.*, 2004). La PKA phosphoryle les sérines S660 et S670 du domaines RD. De cette manière, une première molécule d'ATP vient se fixer sur le domaine NBD1 et conduit à la forme C₁. Cette étape est suivie d'une nouvelle fixation d'ATP sur le domaine NBD2 et donne la conformation C₂. Ainsi, la présence de ces deux molécules d'ATP entraîne un changement de conformation de ces deux domaines ce qui entraîne leur dimérisation NBD1-NBD2 qui se traduit par l'ouverture du canal CFTR. Le cycle du canal CFTR se poursuit puisque l'activité enzymatique des domaines NBDs termine le cycle d'activation. L'hydrolyse de la molécule d'ATP fixée au NBD2 par l'activité hydrolytique du domaine NBD2 en ADP + Pi, déstabilise la structure du dimère NBD1-NBD2 et induit un retour à l'état initial C₁ (**Figure 11 ▼**).

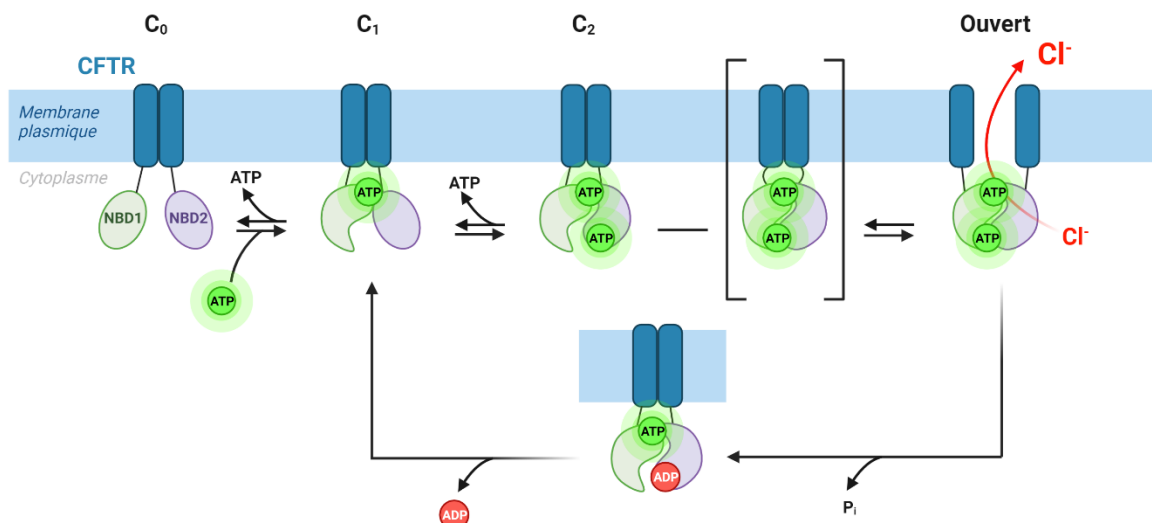


Figure 11: régulation ATP-dépendante de l'ouverture/fermeture du canal CFTR

La protéine CFTR est au repos et adopte la conformation C₀. La fixation d'une molécule d'ATP sur le domaine NBD1 définit la conformation C₁. La fixation d'une deuxième molécule d'ATP sur le domaine NBD2 fait passer le canal en conformation C₂. La formation du dimère NBD1-NBD2 forme l'état stable ouvert du canal CFTR. L'hydrolyse de la molécule d'ATP par le domaine NBD2 entraîne le relargage du phosphate inorganique, conduisant à la fermeture du canal CFTR et au retour à l'état basal C₁. C₀ : aucune molécule d'ATP fixée, C₁ : une molécule d'ATP fixée, C₂ : deux molécules d'ATP fixées, Pi : phosphate inorganique. Illustration modifiée d'après Gadsby *et al.*, 2006.

2.5. Fonctions du canal CFTR

La protéine CFTR est principalement un canal anionique formant un pore sélectif au passage rapide d'ions Cl^- , de bicarbonates et d'autres petits anions à travers la membrane plasmique. De cette manière, le canal CFTR participe à de nombreux processus biologiques qui sont, pour la plupart, liés intimement à ses fonctions de canal ionique. La formation du pore du canal est intimement liée aux résidus de la première boucle extracellulaire puisqu'ils dirigent la sélectivité du canal (Seibert *et al.*, 1997). Outre son rôle de canal anionique, CFTR est un régulateur essentiel de nombreux autres canaux ioniques tels que les canaux Cl^- ORCC et CaCC, l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, le canal sodique ENaC ainsi que le canal potassique ROMK (Schwiebert *et al.*, 1999) (**Figure 12 ▼**). CFTR régule également d'autres activités associées au transport d'ATP, à la régulation du pH et à l'inflammation.

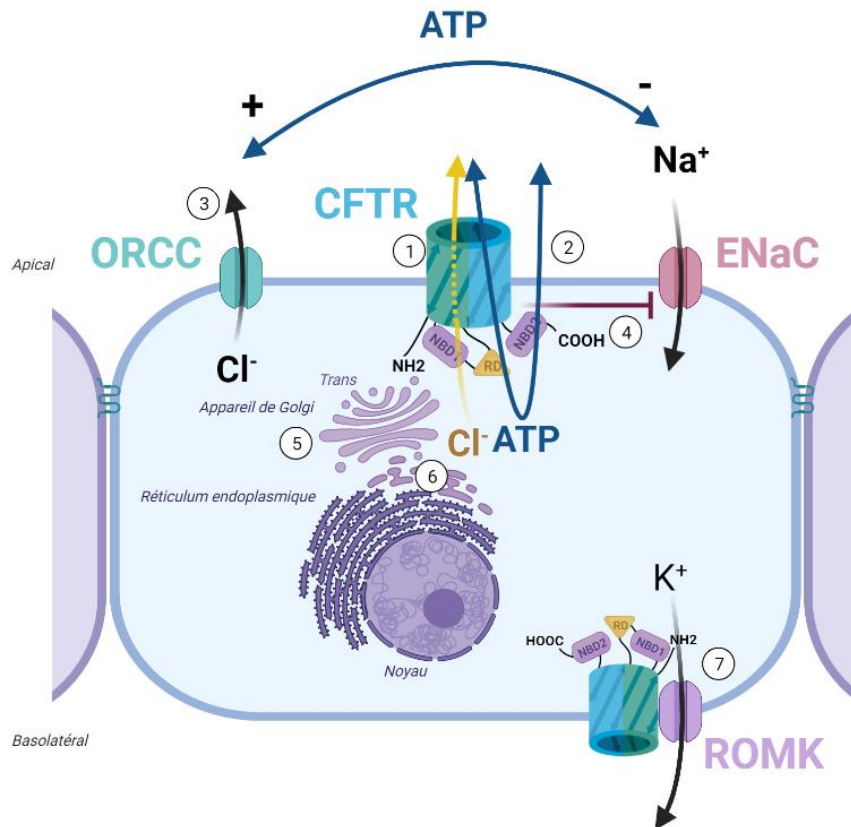


Figure 12: fonctions de CFTR.

CFTR est un récepteur multifonctionnel : 1- fonction de canal Cl^- 2- facilitation de la libération d'ATP, 3- régulation positive des canaux Cl^- (ORCC), 4- Régulation négative des canaux épithéliaux Na^+ (ENaC), 5- régulation du trafic vésiculaire, 6- régulation de l'acidification intracellulaire et des processus protéiques, 7- modulation de la sensibilité de ROMK (d'après Schwiebert *et al.*, 1999).

2.5.1. Transporteur anionique

La principale fonction de CFTR est d'assurer le transport des ions chlorures du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire (Quinton, 1983). L'entrée d'ions chlorure Cl^- dans la cellule se fait par la présence de co-transporteurs ou échangeurs localisés au sein de la membrane basolatérale. L'entrée de ces ions se fait dans le sens de leur gradient électrochimique et augmente la concentration intracellulaire en ion chlorure. Cette différence de concentration intracellulaire/extracellulaire crée une force motrice nécessaire au fonctionnement de CFTR. Ces ions intracellulaires passent par le canal CFTR situé au niveau de la membrane apicale des différentes cellules épithéliales pour rejoindre la lumière. L'existence d'un gradient ionique Cl^- créé par la pompe, participe à la sortie des ions Cl^- dans le sens de leur gradient électrochimique. Cependant, CFTR est décrit comme un transporteur actif secondaire, puisqu'il utilise une molécule d'ATP. Les ions Cl^- sont également capables de sortir par diffusion passive à travers les canaux Cl^- parmi lesquels se trouve le canal ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel) (Egan *et al.*, 1992). CFTR est également un transporteur d'autres ions monoatomiques et possède une perméabilité relative aux différents anions de la manière suivante : $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$ (Linsdell *et al.*, 2000; McCarty and Zhang, 2001). CFTR est également perméable aux ions polyatomiques comme le thiocyanate (SCN^-), le nitrate (NO_3^-), le bicarbonate (HCO_3^-), le méthanoate (HCOO^-) ou encore l'éthanoate (CH_3COO^-). Ainsi sa sélectivité totale est représentée de la manière suivante : $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{HCOO}^- > \text{F}^-$ (Linsdell *et al.*, 2000).

2.5.2. Transport du glutathion

Le glutathion est un pseudo-tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Il est présent sous deux formes, oxydée S-S ou réduite SH, et forme un couple d'oxydoréduction très important aux échanges d'électron. Il intervient dans le maintien du potentiel redox du cytoplasme de la cellule et dans la détoxification et l'élimination des ROS. Le glutathion est un antioxydant anionique et le canal CFTR lui est perméable (Kogan *et al.*, 2003). Cette perméabilité peut expliquer les concentrations élevées de glutathion qui ont été mesurées dans le liquide de surface qui recouvre les cellules épithéliales des voies aériennes. En outre, la perte de cette voie de transport du glutathion liée à la mutation de *CFTR* contribue aux niveaux réduits de glutathion observés dans le liquide de surface des voies aériennes des patients atteints de CF, qui ont été suggérés comme contribuant au stress oxydatif pulmonaire (Linsdell and Hanrahan, 1998).

2.5.3. Régulation des canaux ioniques et transporteurs

2.5.3.1. CFTR, régulateur de canaux chlorure

Le canal CFTR régule positivement le canal chlorure à rectification ORCC. Ce dernier est un canal localisé au sein des membranes apicales et basolatérales des cellules épithéliales. Les travaux de la littérature rapportent que CFTR et ORCC sont des protéines distinctes ayant une relation de régulation. CFTR fonctionnel favorise la sécrétion d'ATP vers le milieu extracellulaire, ce qui participe à l'activation du canal ORCC. Des études utilisant des protéines tronquées ont permis de montrer la nécessité des domaines NBD1 et RD du canal CFTR dans la régulation des canaux ORCC (Schwiebert *et al.*, 1998). Ces deux canaux contribuent donc à la conductance Cl⁻ dépendante de l'AMPc (Gabriel *et al.*, 1993; Schwiebert *et al.*, 1998, 1994).

CFTR est également capable de réguler des canaux chlorure activés par le calcium (CaCC). Ces canaux ont été découverts pour la première fois dans les ovocytes de *Xenopus* (Barish, 1983; Miledi, 1982). Ils sont ubiquitaires et leur fonction physiologique la plus importante est d'assurer la régulation et le contrôle de la perméabilité anionique de la membrane en réponse à l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire (Huang *et al.*, 2009; Oh and Jung, 2016). Les canaux CaCC présents à la membrane apicale des cellules épithéliales, participent avec le canal CFTR, au transport transépithélial d'eau et d'électrolytes (Tarran *et al.*, 2002). Ces canaux semblent d'autant plus avoir une relation fonctionnelle par la protéine d'échafaudage NHERF-1 (Kunzelmann *et al.*, 2012). Bien que les CaCC semblent importants dans la CF, ils ne sont pas en mesure de compenser le manque de CFTR. Cela s'explique par la faible contribution des CaCC à la sécrétion de Cl⁻ dans les voies aériennes et par le fait que l'activation des CaCC est transitoire, contrairement à la sécrétion permanente de Cl⁻ dépendante du CFTR (Kunzelmann *et al.*, 2012). Parmi l'ensemble des canaux CaCC, l'anoctamine-1 (ANO1/TMEM16) est le plus étudié puisqu'il pourrait malgré tout représenter une stratégie intéressante dans la CF (Sonneville *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2020). De nouveaux composés pharmacologiques qui activent directement ANO1, entraînant une sécrétion plus soutenue de Cl⁻, seraient donc des médicaments intéressants, non seulement pour le traitement de la CF mais aussi pour cibler le dysfonctionnement d'autres tissus glandulaires exocrines (Namkung *et al.*, 2011).

2.5.3.2. CFTR, régulateur du canal potassique ROMK

Le canal potassique ROMK (Renal Outer Medullary K⁺ channel), aussi nommé Kir1.1, a été le premier membre de cette famille à avoir été cloné (Ho *et al.*, 1993). ROMK s'exprime uniquement au pôle apical des cellules épithéliales rénales. Le recyclage du potassium par les canaux potassiques apicaux ROMK maintient une quantité suffisante de potassium disponible dans la lumière des tubules rénaux. De cette manière, il participe activement au contrôle du transport d'eau et d'électrolytes à travers la membrane apicale (Mennitt *et al.*, 1997). L'acidification du milieu intracellulaire aura une action inhibitrice sur l'activité de ce canal alors que la présence d'inhibiteurs non spécifiques tel que Ba²⁺ et le Cs⁺ bloquera le récepteur ROMK. Le canal est également inhibé par l'ATP intracellulaire en présence du CFTR mais ces résultats sont discutés (Lu *et al.*, 2006). Il faut noter la présence d'un site de liaison à l'ATP à l'extrémité C-terminale mais le rôle fonctionnel de cette régulation n'a toujours pas été clairement établi (Hibino *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 1993).

2.5.3.3. CFTR, régulateur du canal sodique ENaC

ENaC pour Epithelial Na⁺ Channel, est un canal sodique. L'absorption active d'ions Na⁺ par ENaC crée une différence de potentiel déclenchant une absorption d'eau et de Cl⁻ par la voie paracellulaire de Shunt (Willumsen and Boucher, 1989). ENaC est régulé négativement par le canal CFTR. Le canal ENaC joue un rôle clé dans l'absorption de Na⁺ au niveau apical mais aussi dans la régulation de l'hydratation, du volume du liquide de surface et de la clairance mucociliaire (Donaldson and Boucher, 2007; Stutts *et al.*, 1995). L'absence de CFTR à la membrane plasmique conduit à l'activation continue de ENaC et donc à une augmentation de la concentration intracellulaire en ions Na⁺ des cellules épithéliales CF. Ce déséquilibre conduit à une déshydratation du liquide de surface des voies aériennes ainsi qu'à une augmentation du liquide intracellulaire et de la hauteur épithéliale dues à l'entrée importante d'eau (Guggino and Stanton, 2006).

2.5.3.4. CFTR, régulateur des aquaporines

Les aquaporines sont des protéines transmembranaires omniprésentes jouant un rôle essentiel dans la filtration, l'absorption et la sécrétion des fluides. Découvertes par Peter Agre (Prix Nobel 2003), les aquaporines transportent sélectivement les molécules d'eau par l'intermédiaire de leur groupement Aromatique/Arginine, groupement d'acides aminés qui se fixe aux molécules d'eau, excluant tout autre type de molécule (Agre, 2006). Le canal CFTR régule

positivement l'activité des aquaporines nécessaires au passage de l'eau et de soluté (glycérol, mannitol et sorbitol) à travers la membrane plasmique. Il a été démontré que l'activation de CFTR régule positivement l'aquaporine 3, en augmentant la perméabilité au glycérol en lien avec l'AMPc (Schreiber *et al.*, 2000, 1999).

2.5.4. Régulation du pH

Le canal CFTR régule le transport des anions et cette fonction lui permet également de participer à la régulation du pH non seulement au niveau du liquide de surface épithélial, mais aussi au niveau intracellulaire en acidifiant directement le pH des organites ou en sollicitant indirectement un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ appartenant à la famille SCL26 (Solute-linked carrier 26) (Chang *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010; Soleimani, 2013). Cette régulation influe notamment sur les propriétés lytiques des cellules immunitaires comme les macrophages ou les neutrophiles. Ces cellules développent des invaginations de leur membrane plasmique nécessaire à la phagocytose des agents pathogènes. La fusion des vésicules lysosomales avec les phagosomes favorise la libération des enzymes lysosomales sensibles aux variations du pH. Ainsi, une diminution du pH régulée par CFTR (pH \pm 6 à pH \pm 4,4) active ces différentes enzymes nécessaires à la dégradation des germes phagocytés (Di *et al.*, 2006). En revanche, l'absence CFTR à la membrane du phagolysosome favorise la persistance de l'infection notamment due à la survie et la croissance des bactéries à l'intérieur du phagosome (Di *et al.*, 2006) (**Figure 13 ▼**).

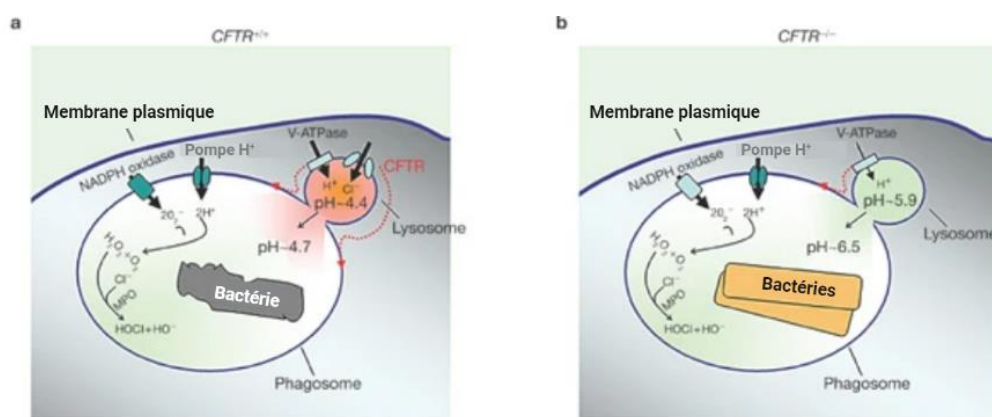


Figure 13: représentation schématique illustrant le rôle de CFTR sur le pH intracellulaire des phagosomes des macrophages des voies aériennes humaines (d'après Di *et al.*, 2006)

2.5.5. Rôle dans l'inflammation

L'ensemble des fonctions associées à CFTR présentées ci-dessus définit ce canal comme un régulateur important dans le maintien de l'homéostasie des organes sécréteurs. A l'inverse, la perte de CFTR conduit à l'apparition d'une inflammation chronique associée à une dérégulation des flux ioniques à travers la membrane plasmique. CFTR joue un rôle central dans l'homéostasie pulmonaire (Matsui *et al.*, 1998). Pour exemple, au sein des poumons CF F508del homozygotes, l'absence de CFTR de la membrane plasmique conduit à une accumulation des protéines mal repliées. Leur rétention au sein du réticulum endoplasmique induit un stress cellulaire participant à l'activation exagérée de la voie de signalisation NF- κ B impliquée dans la production de médiateurs de l'inflammation. De cette manière, la réponse inflammatoire se traduit par une accumulation de neutrophiles, une forte activité protéolytique et un taux anormalement élevé de chimiokines parmi lesquelles se trouvent l'IL-8. La perte du canal se traduit par une réponse inflammatoire forte et exagérée pour combattre les infections persistantes (Saint-Criq and Gray, 2017).

2.6. Les mutations du gène *CFTR*

La découverte du gène *CFTR* a représenté une réelle avancée pour la communauté scientifique. Le lien entre la physiopathologie de la CF et le gène *CFTR* réside dans la présence de mutations génétiques. A ce jour, 2109 mutations du gène *CFTR* sont référencées dans la Cystic Fibrosis Mutation Database (<http://www.genet.sickkids.on.ca>). Les altérations du gène *CFTR* sont de différents ordres. A l'échelle des nucléotides, les mutations les plus majoritaires sont représentées par des mutations faux sens (38,73 %), des insertions-délétions entraînant un décalage du cadre de lecture (16,23 %) ou encore des variations de séquences (12,77 %). Avec des pourcentages inférieurs, d'autres mutations ont également été répertoriées, qu'il s'agisse d'insertions/délétions sans décalage du cadre de lecture (2,04 %), de grands réarrangements (2,8 %), d'altération des séquences promotrices (0,81 %) ou encore de mutation non-sens (8,4 %). Cependant, il reste une proportion importante de mutations inconnues non répertoriées (7,31 %) (**Figure 14 ►**).

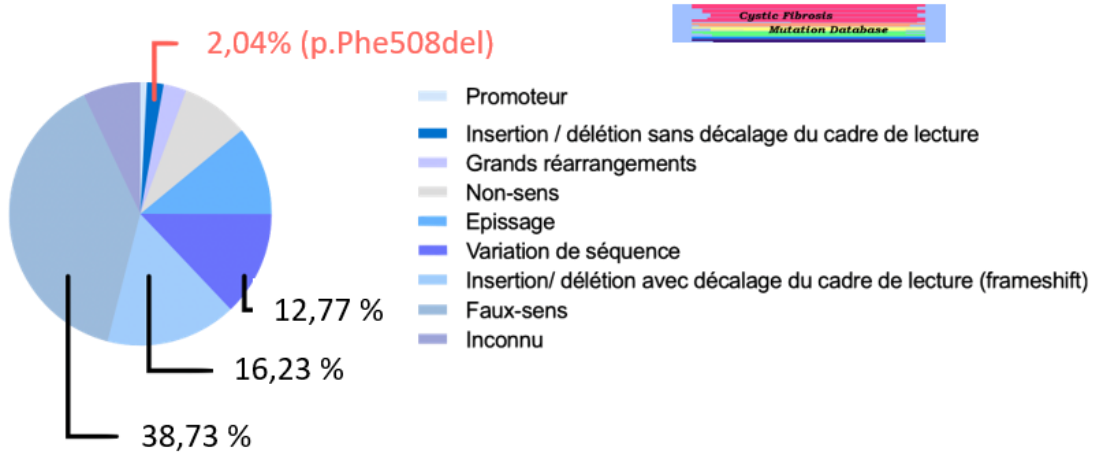


Figure 14: les différentes mutations du gène CFTR

Ces différentes mutations sont classées selon l'impact qu'elles engendrent sur la protéine CFTR et la sévérité de la maladie que cela génère. Les mutations dites « sévères » concernent les mutations de classes I à III et représentent respectivement une absence totale de la protéine CFTR, un défaut d'adressage à la membrane et enfin une protéine CFTR non fonctionnelle. Les mutations dites « modérées » concernent les mutations de classes IV à VI et représentent respectivement une protéine peu fonctionnelle, une synthèse réduite de la protéine et enfin une faible stabilité du canal CFTR à la membrane (Figure 15 ▼).

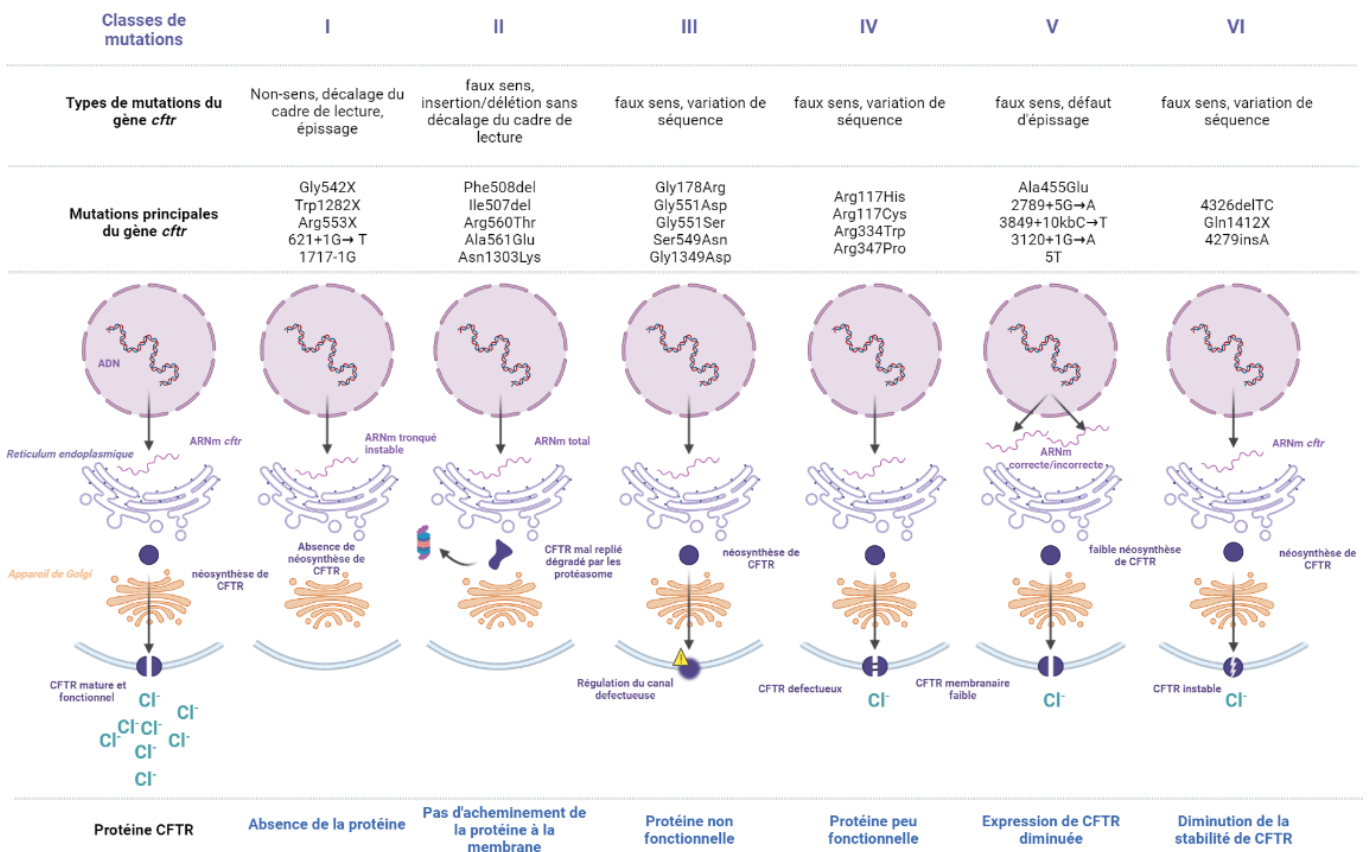


Figure 15: classes de mutations du gène CFTR (d'après Boyle et De Boeck, 2013).

2.6.1. Les mutations de classe I

Les mutations de classe I représentent environ 15 % des mutations portées par les patients CF français (Registre de la mucoviscidose 2019). L'apparition d'un codon stop prématuré par des mutations non-sens, un décalage du cadre de lecture ou encore une maturation post-transcriptionnelle défectueuse entraînent la synthèse d'une protéine incomplète qui sera vite dégradée par le protéasome 26 S. Cette classe de mutation se caractérise donc par une absence de synthèse du canal CFTR.

2.6.2. Les mutations de classe II

Dans un contexte physiologique, la protéine subit des maturations post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique puis est adressée vers l'appareil de Golgi avant d'être distribuée à la membrane plasmique. En revanche, dans le cas d'une mutation de classe II, la protéine est correctement synthétisée mais le repliement (folding) est anormal. Le système de contrôle-qualité réintroduit la protéine CFTR mal repliée dans une nouvelle boucle pour réengager un repliement correct. Elle se retrouve donc séquestrée dans le réticulum endoplasmique où elle va rapidement être dirigée vers le processus de dégradation protéique. Ce défaut de maturation protéique se traduit par une protéine qui pourra faiblement atteindre l'appareil de Golgi, ce qui explique une proportion très réduite de la protéine CFTR mutée à la membrane plasmique. En France, la mutation la plus représentée chez les patients CF est une mutation de classe II. Initialement, cette mutation est induite par la délétion de trois nucléotides (Cytosine-Thymine/Thymine, C-TT) au sein de l'exon 10 sans entraîner de décalage du cadre de lecture. Selon la Human Genome Variation Society, la nomenclature officielle de cette mutation est p.Phe508del couramment abrégée F508del. Cette mutation conduit à l'absence de la phénylalanine (Phe/F) en position 508 (F508del). Cette mutation à l'état homozygote (classe II / classe II) représente 83,2 % des patients du registre français de la mucoviscidose 2020. Elle conduit à un défaut de conformation, de maturation et de transport intracellulaire de la protéine CFTR à la membrane.

2.6.3. Les mutations de classe III

La protéine CFTR est correctement synthétisée et présente à la membrane plasmique mais est non fonctionnelle. Ce défaut est dû à une régulation défectueuse du canal par altération du processus d'activation. Les mutations de classes III entraînent un défaut de la phosphorylation du domaine RD (Serre *et al.*, 1993) et sont majoritairement des mutations faux-

sens. Ces dernières sont localisées dans les domaines NBD1 et NBD2, c'est-à-dire les domaines de fixations des nucléotides (ATP) indispensables à la régulation des cycles d'ouverture/fermeture du canal CFTR. Ainsi, la probabilité d'ouverture du canal est plus faible ce qui participe à une modification des efflux Cl⁻.

2.6.4. Les mutations de classe IV

La protéine CFTR est correctement synthétisée et présente à la membrane plasmique des cellules épithéliales. Sa régulation est optimale mais la présence des mutations de classes IV altère la conductance ionique du canal CFTR. Ces mutations sont localisées au niveau des domaines transmembranaires, domaines essentiels à la formation du pore du canal et à son fonctionnement. Ainsi, les efflux d'ions Cl⁻ ainsi que la sélectivité du canal CFTR vis-à-vis de ces ions, sont altérés, ce qui caractérise le canal CFTR comme peu fonctionnel (Sheppard *et al.*, 1993).

2.6.5. Les mutations de classe V

L'ARNm muté est instable ce qui se traduit par une quantité restreinte de protéines CFTR à la membrane apicale des cellules épithéliales. En effet, les mutations de classes V peuvent être localisées au sein des régions promotrices ce qui induit une diminution des transcrits *CFTR*. Ces mutations concernent également un défaut d'épissage conduisant à une diminution de la stabilité des ARNm mutés codant la protéine CFTR. Enfin, la présence de mutations faux-sens au sein des régions codantes induit un trafic intracellulaire inefficace de la protéines CFTR vers la membrane plasmique.

2.6.6. Les mutations de classe VI

La protéine CFTR mutée possède une bonne localisation, une bonne régulation d'ouverture/fermeture ainsi qu'une bonne conductance vis-à-vis des ions Cl⁻. En revanche, la présence de mutations de classe VI induit la délétion de 70 à 98 résidus amino-acides à l'extrémité C-terminale de la protéine CFTR tronquée. Cette extrémité est à l'origine de la demi-vie du canal et la présence de la mutation conduit à une instabilité de la protéine CFTR à la membrane (Haardt *et al.*, 1999).

Des exemples de mutation des différentes classes sont présenté dans le tableau 1.

La combinaison allélique des mutations de *CFTR* permet de mieux caractériser le phénotype pathologique des patients CF. En effet, la présence d'une mutation « sévère » sur chacun des allèles conduit à des formes sévères de la maladie, associées notamment à une insuffisance pancréatique et à une atteinte pulmonaire dès la naissance (Férec, 2021). En revanche, la combinaison de deux mutations « modérées » ou même d'une mutation « sévère » et d'une mutation « modérée » est associées à un phénotype moins sévère de la CF. Il se résume par une espérance de vie supérieure à 40 ans puisque dans un premier temps la fonction pancréatique exocrine est conservée avec souvent une colonisation tardive par *Pseudomonas aeruginosa* au sein de l'appareil respiratoire (Riordan *et al.*, 1989).

Classe	Nomenclature	Localisation	Description	Conséquence	Mutation	En France (%)*
I	621+1G→T	intron 4	G par T au 621+1	Epissage défectueux	Epissage	0,4
	1717-1G→A	intron 11	G par A au 1717-1	Epissage défectueux	Epissage	2,1
	G542X	exon 12	G par T au 1756	Glycine par un codon Stop en position 542	Non-sens	5,6
	R553X	exon 12	C par T au 1789	Arginine par un codon stop en position 553	Non-sens	1,8
	W1282X	exon 23	G par A au 3978	Tryptophane par un codon Stop en position 1282	Non-sens	1,5
II	I507del	exon 11	délétion de 3 bases entre les nucléotides 1648/1653	Délétion d'une isoleucine en position 506 ou 507	Délétion	1,1
	F508del	exon 11	délétion de 3 bases entre les nucléotides 1652/1655	Délétion d'une phénylalanine en position 508	Délétion	83,3
	R560T	exon 12	G en C en position 1811	Arginine par une thréonine en position 560	Mutation faux-sens	-
	A561E	exon 13	C en A en position 1814	Alanine en glutamine en position 561	Mutation faux-sens	-
	N1303K	exon 24	C par une A en position 4041	Asparagine en lysine en position 1303	Mutation faux-sens	4,1
III	G178R	exon 5	G par une A en position 664	Glycine en arginine au résidu 178	Mutation faux-sens	-
	S549N	exon 12	G par A en position 1779	Sérine par une asparagine au résidu 549	Mutation faux-sens	-
	G551S	exon 12	G par A en position 1783	Glycine par une sérine au résidu 551	Mutation faux-sens	-
	G551D	exon 12	G par A en position 1784	Glycine par une asparagine au résidu 551	Mutation faux-sens	1,8
	G1349D	exon 25	G par A en position 4178	Glycine par une asparagine au résidu 1349	Mutation faux-sens	-
IV	R117H	exon 4	G par A en position 482	Arginine en histidine au résidu 117	Mutation faux-sens	2
	R117C	exon 4	C par T en position 481	Arginine en cystéine au résidu 117	Mutation faux-sens	-
	R334W	exon 8	C par T en position 1132	Arginine en tryptophane au résidu 334	Mutation faux-sens	0,7
	R347P	exon 8	G en C en position 1172	Arginine en proline au résidu 347	Mutation faux-sens	1
	R347H	exon 8	G en A en position 1172	Arginine en histidine au résidu 347	Mutation faux-sens	0,6
V	A455E	exon 10	C en A en position 1496	Alanine en acide glutamique au résidu 455	Mutation faux-sens	0,7
	2789+5G→A	intron 16	G en A en position 2789 + 5	Epissage défectueux	Epissage	2,6
	3120+1G→A	intron 18	G en A en position 3120 + 1	Epissage défectueux	Epissage	0,8
	3849+10kbc→T	intron 22	C en T en position 3849	insertion de 10 kb (intron 19) + épissage défectueux	Insertion avec décalage du cadre de lecture	1,4
VI	4326delTC	exon 26	délétion de TC depuis la position 4326 à 4327	Décalage du cadre de lecture	Délétion avec décalage du cadre de lecture	-
	Q1412X	exon 26	C en T en position 4366	Glutamine en codon stop au résidu 1412	Non-sens	-
	4279insA	exon 26	Insertion d'un A après la position 4279	Décalage du cadre de lecture	Insertion avec décalage du cadre de lecture	-

Tableau 1: mutations majoritaires du gène *CFTR* en fonction des différentes classes en France (registre français de la mucoviscidose 2019)

A : adénine ; C : cytosine ; T : thymine ; G : guanine

Le phénotype des patients CF sera également dépendant de facteurs environnementaux comme le tabagisme, les facteurs socio-économiques, le respect des traitements ainsi que d'autres facteurs génétiques appelés gènes modificateurs. Ce rapprochement phénotype/gènes modificateurs a été établi lorsque pour deux jumeaux monozygotes possédant les mêmes mutations, leur expression clinique de la CF était différente (Mekus *et al.*, 2000). Ces gènes modificateurs sont situés en dehors du locus *CFTR* et possèdent une influence favorable ou

défavorable sur la sévérité de la maladie. Étant donné que la sévérité de la CF semble dépendante de ces gènes modificateurs, une approche de région chromosomique candidate a été développée. Cette approche gène-candidat a permis de mettre en évidence des gènes modificateurs susceptibles d'influencer la sévérité de la maladie, parmi lesquels se trouvent notamment des gènes associés à la défense anti-microbienne (MBL2, NOS1 et NOS3) ou encore des gènes associés à la réponse immuno-inflammatoire (TNF- α , ACE (enzyme de conversion à l'angiotensine-2), IL-10 ou encore TGF- β 1) (Corvol *et al.*, 2006). De plus, en regroupant une cohorte de plus de 6500 patients, la formation de plusieurs consortiums internationaux de recherche associés aux gènes modificateurs a permis de développer une approche globale par analyse du génome entier (Genome Wide Association Study, GWAS) des patients CF. Ainsi, il a été mis en évidence de nombreux loci potentiellement à l'origine de l'ileus méconial néonatal, une occlusion intestinale causée par un contenu intestinal trop épais. Parmi ces loci se trouvent *SLC26A9* (SoLute Carrier family 26 member 9, rs7549173), *SCL6A14* (SoLute Carrier family 6 member 14, rs3788766), *ATP12A* (ATPase H⁺/K⁺ transporting non-gastric alpha 2 subunit, rs61948108), *TARS* (Threonyl-tRNA Synthetase, rs139816984), *PRSSI* (Serine Protease 1, rs3757377) et *CEBPB* (CCAAT Enhancer Binding Protein Beta, rs2094716). Pour exemple, *SLC6A14* est un transporteur d'acides aminés mais de nombreuses études suggèrent que cette protéine pourrait moduler la réponse anti-infectieuse et/ou l'intégrité de l'épithélium des voies aériennes (Ruffin *et al.*, 2020). Ainsi, l'analyse fonctionnelle du polymorphisme nucléotidique ou SNP (single-nucleotide polymorphism) des gènes associés à chaque locus modificateur pourrait identifier de nouvelles cibles pour le traitement de la CF. Naturellement, même si ces gènes modificateurs ne sont pas la conséquence de la mutation à l'origine de la CF, ils peuvent en influencer sa physiopathologie. Des études de ces gènes modificateurs permettraient de schématiser l'issue de la maladie en fonction du génotype/phénotype et du lien avec les gènes modificateurs chez les patients CF. A terme, l'intérêt de ces études serait de favoriser le développement d'une médecine personnalisée et individualisée, notamment par le développement de petites molécules ciblant ces variants spécifiques dans la CF (Corvol *et al.*, 2015).

3. Aspect clinique de la CF

3.1. Diagnostic et dépistage de la CF

L'amélioration de la prise en charge des patients CF repose avant tout sur un dépistage précoce de la CF. Ce dépistage peut être réalisé avant la naissance par la réalisation d'une

amniocentèse ou d'un prélèvement de cellules du placenta dans l'utérus de la femme enceinte en vue d'une analyse génétique de l'embryon. Ce dépistage est proposé après un conseil génétique ou après une échographie obstétricale détectant une anomalie du transit intestinal chez l'enfant. Le dépistage prénatal peut être également mis en place lorsqu'il s'agit d'une fécondation *in vitro*. En effet, un diagnostic pré-implantatoire de la CF peut être réalisé après un conseil génétique en vue de sélectionner un embryon non malade à implanter dans l'utérus de la future mère. Toutefois la CF n'est pas systématiquement dépistée avant la naissance du nouveau-né mais reste caractérisée dans la plus grande majorité des cas lors du dépistage néonatal (DNN). La France a été précurseur dans la mise en place systématique d'un DNN et cette procédure reste sous la responsabilité de l'Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant (AFDPHE). En France, le DNN de la CF est généralisé depuis avril 2002 et comprend quatre étapes TIR-PAP-ADN-Sueur. Les professionnels de santé réalisent le test de Guthrie après la naissance du nouveau-né par le prélèvement de sang au talon ou au doigt du bébé sur papier buvard (**Figure 16 ▼**).

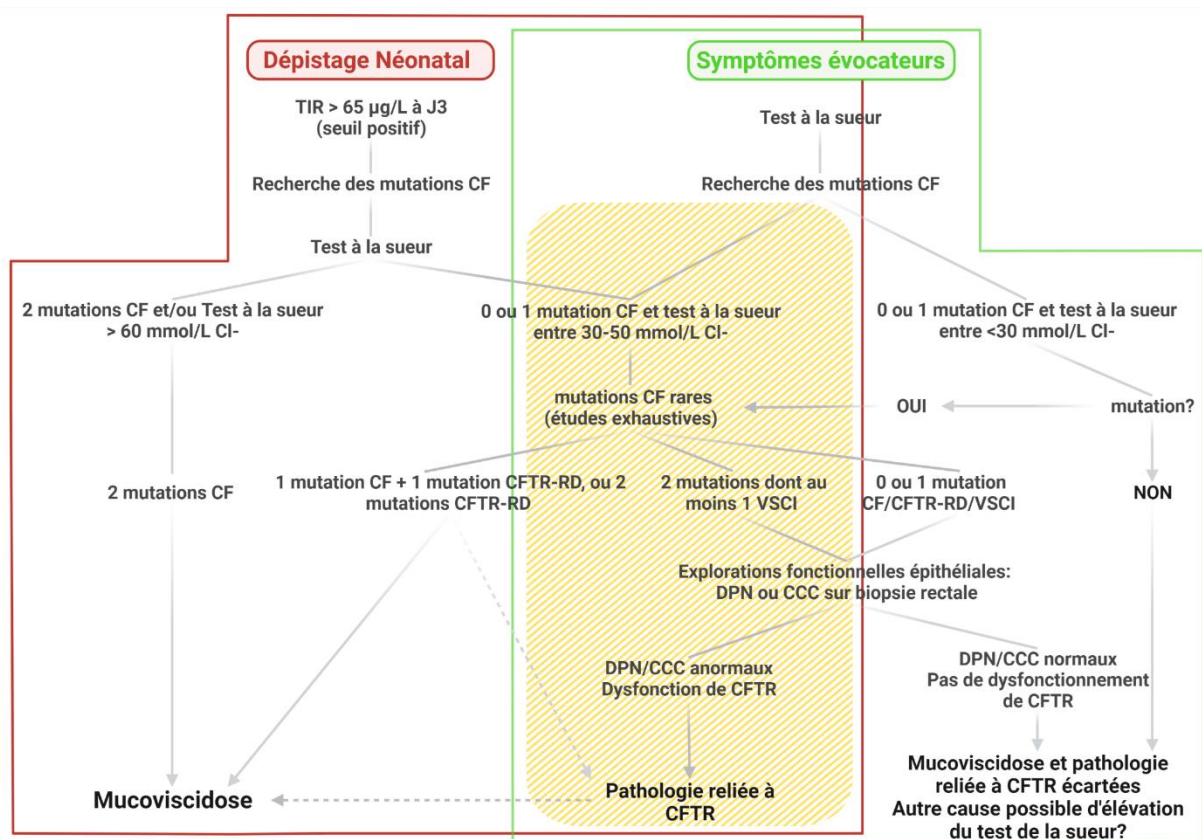


Figure 16: algorithme de prise en charge et du suivi des nourrissons dans le dépistage de la CF (Sermet-Gaudelus et al., 2017).

3.1.1. Dépistages des enzymes pancréatiques

Le test de Guthrie permet dans un premier temps le dosage de la Trypsine Immunoréactive (TIR). Le prélèvement est réalisé à trois jours (J3) et trois semaines de vie (J21) du nouveau-né. Pour les enfants CF, le taux de TIR reste supérieur à 65 µg/L (seuil positif) pendant le premier mois de vie. La trypsine est synthétisée par les cellules acineuses du pancréas sous forme d'une pro-enzyme, le trypsinogène. L'obstruction du pancréas empêche le passage du trypsinogène du pancréas vers l'intestin grêle avec pour conséquence un passage par les vaisseaux sanguins. Cette anomalie peut donc être détectée en mesurant la trypsine « immunoréactive » sanguine traduisant une atteinte pancréatique à la naissance. Ce test est assez sensible puisque le pourcentage de faux négatifs reste assez faible (3,7 %) même s'il est malgré tout peu spécifique par la présence de faux positifs. Toujours associée à une anomalie pancréatique, la mesure de la protéine associée à la pancréatite (PAP) peut être dépistée. C'est une protéine normalement non synthétisée par le pancréas sain mais qui est exprimée en grande quantité par le pancréas CF dès la vie *in utero*. Le dépistage positif de la TIR conduit à une poursuite du diagnostic de la CF par une analyse génétique des mutations les plus courantes du gène *CFTR* avec le consentement parental écrit.

3.1.2. Analyse génétique

Les mutations recherchées peuvent être variables et adaptées à la population testée. Il existe différentes classes de mutations recherchées parmi lesquelles se trouvent :

- les mutations CF (classe A) que sont des mutations associées à des formes classiques de la CF
- les mutations CFTR-RD, pour CFTR-related disorders (classe B), qui représentent des mutations supposées modérées voir mineures
- les mutations à large spectre (classe A/B) qui regroupent des mutations retrouvées à la fois chez des patients CF (souvent modérés) comme des patients adultes atteints de forme mono-symptomatique
- des variations de séquence neutre ou sans impact clinique reconnu (classe C)
- des variations de séquence de signification clinique non reconnue (classe D)

Dans le tableau 2 suivant sont répertoriées les variations de séquence du gène *CFTR* en fonction de leur classification phénotypique utilisée dans la routine des laboratoires d'analyse génétique pour le diagnostic de la CF (Castellani *et al.*, 2008; Dequeker *et al.*, 2009).

Les techniques de recherches ciblées de mutation permettent d'identifier 80 à 90 % des allèles mutés chez les patients CF. En revanche, la recherche de mutation rare se fait par analyse

de l'ensemble des régions codantes via la méthode Sanger ou via le séquençage de nouvelle génération NGS (Next-Generation Sequencing). Enfin, les méthodes d'études du gène *CFTR* s'appuient aussi sur la recherche de grand réarrangement de séquence. La recherche des délétions, duplications et insertions sera effectuée à l'aide de différentes techniques parmi lesquelles se trouvent la PCR multiplex, l'Hybridation Génomique Comparative ou CGH Arrays (Comparative Genomic Hybridization) pour l'identification d'anomalie chromosomique ou encore la technique NGS.

Ces analyses permettent de mettre en évidence une, voire deux mutations, à l'origine de la CF mais le diagnostic se poursuit par la réalisation d'un test de la sueur.

Classes de variants	Principales mutations			
Associées à la mucoviscidose CF (A)	c.254G>A (G85E) c.262_263del (394delTT) c.178G>T (E60X) c.366T>A (Y122X) c.489+1G>T (621+1G>T) c.579+1G>T (711+1G>T) c.1000C>T (R334W) c.1040G>C (R347P) c.948del (1078delT) c.1364C>A (A455E) c.1477_1478del (1609delCA)	c.1523_1523del (F508del) c.1519_1521del (I507del) c.1545_1546del (1677delTA) c.1585-1G>A (1717-1G>A) c.1624G>T (G542X) c.1646G>A (S549N) c.1647T>G (S549R) c.1652G>A (G551D) c.1654C>T (Q552X) c.1657C> (R553X) c.1679G>C (R560T) c.1680-886A>G (1811+1.6kbA>G)	c.1766+1G>A (1898+1G>A) c.2012del (2143delT) c.2051_2052delinsG (2183AA>G) c.2052dup (2184insA) c.2128A>T (K710X) c.2215del (2347delG) c.2538G>A (W846X) c.2668C>T (Q890X) c.2988+1G>A (3120+1G>A) c.3196C>T (R1066C) c.3276C>A (Y1092X)	c.3302T>A (M1101K) c.3484C>T (R1162X) c.3528del (3659delC) c.3472C>T (R1158X) c.3731G>A (G1244E) c.3752G>A (S1251N) c.3773dup (3905insT) c.3846G>A (W1282X) c.3909C>G (N1303K) c.54-5940_273+10250del21080 (CFTRdele2,3)
Associées à un large spectre phénotypique CF/CFTR-RD (AB)	c.328G>C (D110H) c.617T>G (L206W) c.1040G>A (R347H)	c.1210-34TG[13]T[5] (TG13T5) c.2657+5G>A (2789+5G>A)	c.3140-26A>G (3272-26A>G) c.3208C>T (R1070W)	c.3454G>C (D1152H) c.3718-2477C>T (3849+10kbC>T)
Associées à la pathologie CFTR CFTR-RD (B)	c.91C>T (R31C) c.350G>A (R117H;T7) c.1210-34TG[12]T[5]	c.349C>T (R117C) c.[220C>T;3808G>A] (R74W;D1270N)	c.2991G>C (L997F) c.1865G>A (G622D) c.[1327G>T;1727G>C;2002C>T] (D443Y;G576A;R668C)	c.3154T>G (F1052V) c.4056G>C (Q1352H)
De pathogénicité indéterminée (D)*	c.579+3A>G (711+3A>G) c.695T>A (V232D) c.1055G>A (R352Q)	c.1069G>A (A357T) c.1367T>C (V456A)	c.1666A>G (I556V) c.1801A>T (I601F)	c.2855T>C (M952T) c.869+5G>A (1001+5G>A)
Sans impact clinique reconnu (C)	c.-8C>G (125G>C) c.224G>A (R75Q) c.743+40A>G (875+40A>G)	c.1210-34TG[11]T[5] (TG11T5) c.1408G>A (M470V) c.1523T>G (F508C)	c.1584G>A (E528E) c.2562T>G (T854T) c.2620-15C>G (2752-15C>G)	c.3469-20T>C (3601-20T>C) c.3870A>G (P1290P)

Tableau 2: mutations du gène *CFTR* en fonction de leur classification phénotypique (bonnes pratiques des études du gène *CFTR*, Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire, 2016).

3.1.3. Test de la sueur

Le test de la sueur ou test de sudation fait partie du dépistage néonatal systématique national de la CF. Il s'est imposé comme une technique de référence dans le diagnostic de la maladie (Gibson and Cooke, 1959). Le test de la sueur peut être réalisé par les Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM). Ce test permet de quantifier la concentration sudorale en ion chlorure seuls ou de l'ensemble des ions contenus dans la sueur du nouveau-né. Il est divisé en trois étapes clés avec la stimulation des glandes sudoripares, le recueil de la sueur sécrétée et son dosage. Le principe de ce test repose sur la stimulation des glandes sudoripares par la pilocarpine (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2010). La récupération de la

sueur excrétée constitue une étape délicate qui se fera notamment par la mise en place d'un dispositif de collecte de la sueur afin d'éviter son évaporation. Trois méthodes de collecte de la sueur sont utilisées aujourd'hui : un papier filtre Whatman pour un dosage titrimétrique, l'utilisation d'une cupule pour concentrer les gouttelettes de sueur et enfin la méthode de recueil par microcapillaire non mouillant. Enfin, le dosage des ions sécrétés dans la sueur est réalisé de deux manières différentes, soit par coulométrie nécessaire au dosage des ions Cl^- (mmol/L Cl^-), soit par conductimétrie en dosant les ions sudoraux (mmol/L Eq NaCl) (Hammond *et al.*, 1994). Les valeurs usuelles quel que soit l'âge sont une quantité d'ions chlorure inférieure à 30 mmol/L Cl^- pour une conductivité inférieure à 50 mmol/L Eq NaCl. En revanche, le seuil pathologique compatible au diagnostic de la CF, après exclusion des situations susceptibles d'entraîner une élévation des ions chlorure sudoraux, est une coulométrie supérieure à 60 mmol/L Cl^- . Le diagnostic de la CF est confirmé après avoir obtenu deux tests de la sueur positifs. Pour les patients atteints de formes atypiques de la maladie et ayant une concentration en ions chlorure douteuse ou comprise entre 40 à 60 mmol/L au test de la sueur, d'autres méthodes sont employées pour orienter le diagnostic comme la mesure de la différence de potentiel (ddp) transépithélial nasal ou encore l'analyse du courant de court-circuit sur biopsie rectale.

3.1.4. Méthodes supplémentaires pour le diagnostic de la CF

3.1.4.1. La différence de potentiel nasal

La différence de potentiel nasal (DPN) trans-épithélial permet de mesurer la ddp *in vivo* au niveau des voies aériennes supérieures à l'aide d'un millivoltmètre. Cette technique permet de vérifier les propriétés électrophysiologiques des deux principaux régulateurs de l'hydratation du liquide de surface des voies aériennes, les canaux ENaC et CFTR (Solomon *et al.*, 2018). Pour les sujets sains, les ions chlorures sortent par le pôle apical. Ces mouvements ioniques sont rendus possibles par le canal CFTR qui génère une ddp transépithéliale qui peut être mesurée. En revanche, pour les patients CF, l'excrétion des ions chlorure par le pôle apical ne se fait plus correctement, ce qui engendre également une absorption accrue des ions sodium à l'intérieur de la cellule (Rosenstein and Cutting, 1998). Sur le principe, après une abrasion de la peau, une électrode de référence est placée au niveau de l'avant-bras dans le tissu sous-cutané. Une seconde électrode dite « exploratrice » est positionnée au contact du pôle apical de l'épithélium nasal, au niveau du plancher du cornet inférieur. Le patient est perfusé de différentes solutions au niveau de l'électrode exploratrice : une solution sans chlorure permet

d'observer la perméabilité réelle aux ions chlorure de l'épithélium nasal ; une solution de Ringer supplémentée d'un inhibiteur du canal ENaC, l'amiloride, pour mesurer l'absorption active des ions sodiques dans l'établissement de la DPN ; une solution d'isoprotérénol favorisant une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc et donc une activation de la sécrétion d'ion chlorure par le canal CFTR. La solution d'isoprotérénol permet d'observer chez le sujet sain une ddp plus négative alors que ce traitement semble inefficace pour les patients CF indiquant un canal CFTR non fonctionnel. Les valeurs basales correspondent à l'absorption des ions sodium Na^+ par le canal ENaC dont l'activité est normalement diminuée par le canal CFTR. Chez les sujets sains, la DPN moyenne est de -20 mV (milliVolt) tandis que chez les patients CF, cette DPN est de l'ordre de -45 mV due notamment à une absorption massive d'ions Na^+ (Sands, 2013).

3.1.4.2. *Le courant de court-circuit sur biopsie rectale*

La mesure du courant de court-circuit (CCC ; Short circuit courant I_{sc}) sur biopsie rectale, appelée également Intestinal current measurements (ICM), permet d'étudier le défaut du canal CFTR *ex vivo*. Des chambres de Ussing sont utilisées pour enregistrer le CCC transépithélial ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) sur des échantillons humains fraîchement obtenus par aspiration rectale. Les biopsies sont stimulées séquentiellement par l'amiloride, afin de bloquer les canaux ENaC, la forskoline et la génistéine pour activer la sécrétion AMPc-dépendante des ions chlorure afin de mettre en évidence une activation du canal CFTR, et enfin un inhibiteur de CFTR, le CFTRinh172. D'autres substances pharmacologiques peuvent toutefois être utilisées comme le carbachol, un activateur de la sécrétion des ions Cl^- dépendante du Ca^{2+} (Dharmasathaporn and Pandol, 1986). Toutefois, cette méthode présente des limites. En effet, les résultats peuvent être dépendants de la qualité de la biopsie ou encore de la perte de l'intégrité du tissu puisque le prélèvement doit être utilisé dans un temps inférieur à deux heures à la suite du prélèvement.

3.2. **Manifestations cliniques pulmonaires de la CF**

La CF est une pathologie qui touche de nombreux organes, avec une atteinte digestive aux niveaux gastro-intestinal, pancréatique et hépatobiliaire, une atteinte osseuse, rénale, ORL, également au niveau de l'appareil reproducteur, et enfin une atteinte pulmonaire. Cette dernière étant responsable de la morbi-mortalité de la CF, nous ne présenterons qu'elle.

3.2.1. Altérations de la clairance mucociliaire

La clairance mucociliaire dépend de l'équilibre entre trois éléments : la sécrétion des mucines, la hauteur du liquide de surface ou Airway Surface Liquid (ASL) et enfin le battement ciliaire. La clairance mucociliaire est un mécanisme de protection de l'épithélium bronchique dont le fonctionnement est dérégulé dans la CF, favorisant ainsi la stase du mucus et la persistance des contaminations bactériennes. Les mucines, sécrétées principalement par les glandes séro-muqueuses, sont surexprimées et hypersécrétées dans la lumière des voies aériennes, le liquide périciliaire se retrouve réduit le mucus est dense et hyper-visqueux ce qui concoure à l'écrasement des cils. La clairance mucociliaire est ainsi réduite à des battements ciliaires inefficaces incapables d'éliminer les particules ou les xénobiotiques inhalés. Enfin, l'altération de la clairance mucociliaire s'accompagne également d'obstructions bronchiques sévères et d'infections bactériennes (Cuthbert, 1991).

3.2.2. Les infections bactériennes

Les voies aériennes des patients CF sont très sensibles aux infections bactériennes. L'environnement déséquilibré par le dysfonctionnement ou l'absence de CFTR est favorable à la prolifération et à la colonisation bactérienne. Cette colonisation des voies aériennes supérieures et inférieures peut être variable en fonction de l'âge des patients. Une sélection de 20 études a permis de définir un profil de colonisation bactérienne en fonction du fait qu'il s'agit d'une CF infantile ou adulte (Meskini *et al.*, 2021). Le pourcentage de prévalence chez les nourrissons et les enfants est le plus élevé pour *Streptococcus spp.* (19 %) suivi par *Haemophilus spp.* (14 %) avec un pourcentage de prévalence le plus bas pour *Burkholderia* (5 %), *Corynebacterium spp.* (5 %) et *Methylobacterium* (5 %), *Moraxella spp* (5 %), *Porphyromonas* (5 %), et *Staphylococcus spp* (5 %). Chez les adultes CF, la prévalence est plus élevée pour *Pseudomonas spp.* (18 %) et *Staphylococcus spp.* (9 %) avec les pourcentages les plus faibles pour *Mycobacterium avium* (4 %), *Candida lusitaniae* (4 %) et *Achromobacter* (4 %). Ces résultats semblent mettre en évidence un modèle de colonisation bactérienne en fonction de l'âge et de l'évolution de la pathologie.

3.2.3. Altération de la défense immunitaire et inflammation pulmonaire

L'absence du canal CFTR altère les défenses innées. En effet, la modification de la composition et du pH du liquide de surface de l'épithélium des voies aériennes impacte l'activité des peptides antimicrobiens (Smith, 1996). De plus, les défensines sont dépendantes

de la concentration ion Na^+ et sont inactives en absence de CFTR (Ratjen, 2009). De cette manière, la réponse inflammatoire accrue et exacerbée conduit à la détérioration du tissu pulmonaire (Delacourt, 2003). La sécrétion exagérée de cytokines pro-inflammatoires (IL-8), la présence d'un stress oxydatif, un recrutement massif de cellules immunitaires (polynucléaires neutrophiles (PNN) et macrophages) ainsi qu'un défaut de sécrétion de glutathion, induit par le dysfonctionnement de CFTR, favorisent l'inflammation chronique des voies respiratoires dans la CF (Cohen and Prince, 2012). La mobilisation des PNN au site inflammatoire conduit à la libération de protéases et d'oxydants responsables de la destruction pulmonaire, ainsi que d'ADN bicaténaire extracellulaire (NET) dont le rôle est orienté vers la séquestration des bactéries présentes dans les voies ariennes mais qui participe également à l'augmentation de la viscosité du mucus (**Figure 17 ▼**).

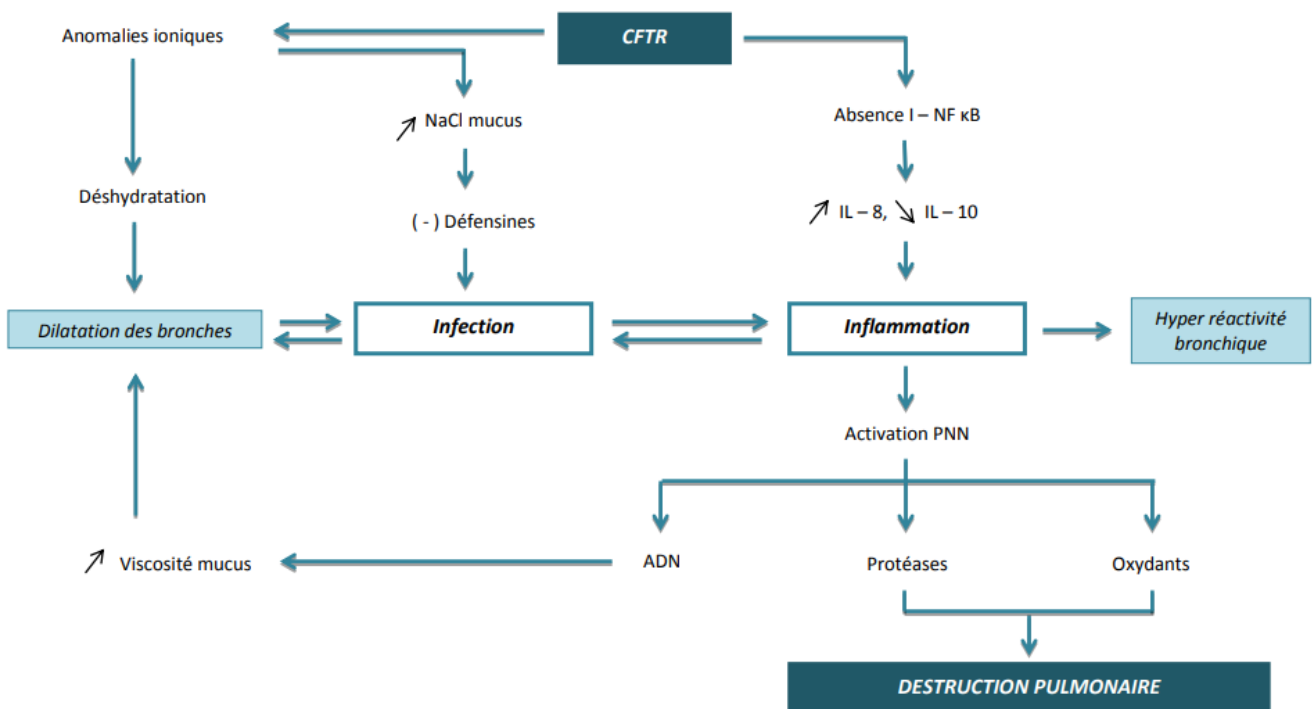


Figure 17 : physiopathologie de la CF (d'après Benoît Gehl, « inflammation et mucoviscidose : intérêt d'une prise en charge nutritionnelle », Thèse de doctorat en pharmacie, sous la direction du Docteur Marc Merten, Vandoeuvre-les-Nancy, Faculté de Pharmacie, 2018).

3.2.4. Pathologies pulmonaires associées à la CF

Chez les jeunes enfants CF, l'atteinte pulmonaire se caractérise par des bronchites répétées avec une toux persistante. Les enfants CF plus âgés présentent des signes d'insuffisance respiratoire chronique avec des sécrétions muco-purulentes. Ces sujets subissent des infections et une inflammation pulmonaire chronique induite soit par une bronchite à *Staphylococcus* ou à *Pseudomonas*, soit par une pneumonie ou encore par des bronchiolites, infections respiratoires des bronchioles. Ces infections engendrent l'encombrement des voies respiratoires par l'accumulation des sécrétions muco-purulentes. L'inflammation chronique provoquée par la libération de protéases et de cytokines pro-inflammatoires contribue, avec les infections, aux lésions pulmonaires. Ce contexte pathologique engendre des dilatations et destructions des bronches, les bronchectasies. Les obstructions bronchiques (bouchons muqueux) bloquent alors le flux d'air et peuvent engendrer un collapsus du tissu pulmonaire ou atelectasie défini par un effondrement d'une partie ou de l'ensemble du poumon. D'autres signes d'atteintes pulmonaires peuvent être observés chez les patients CF comme la présence de sang en provenance des voies respiratoires (hémoptysie) ou encore des difficultés ou gêne à la respiration (dyspnée). Le suivi des patients CF permet d'évaluer en fonction du temps les atteintes respiratoires par la réalisation des épreuves fonctionnelles respiratoires (EFR) au moyen d'un spiromètre. Cet examen participe au diagnostic d'une affection respiratoire et permet d'évaluer l'état respiratoire en mesurant notamment le volume d'expiration maximum en une seconde (VEMS) ou encore la quantité d'air expulsée dans la première seconde du test ou Capacité Vitale Forcée (CVF). Pour exemple, le VEMS décroît de 1 à 1,5 % par an pour les patients CF ce qui explique une chute du VEMS en fonction de l'âge. De plus, le rapport VEMS/CVF ou coefficient de Tiffeneau permet d'évaluer le degré d'obstruction bronchique. Pour une valeur anormale et inférieure à 0,7, ce coefficient définit un trouble ventilatoire obstructif non réversible. Un examen cyto bactériologique des crachats (ECBC) est également réalisé pour une évaluation microbiologique avec potentiellement un suivi radiologique par scanner thoracique en cas de suivi d'infection respiratoire.

3.3. Prise en charge de la pathologie pulmonaire dans la CF

La prise en charge de l'atteinte pulmonaire dans la CF est établie selon trois axes, concernant à la fois l'amélioration de la clairance mucociliaire, la prise en charge des infections bactériennes et de l'inflammation pulmonaire respectivement par l'administration d'antibiothérapies et de traitements anti-inflammatoires.

3.3.1. *Approches thérapeutiques pour la clairance mucociliaire*

L'encombrement des bronches réduit l'efficacité de la clairance mucociliaire. La présence du maillage d'ADN extracellulaire des neutrophiles demande la mise en place d'un traitement par une désoxyribonucléase recombinante humaine. La dornase alfa, commercialisée sous le nom de Pulmozyme® (2 500 U / 2,5 mL), hydrolyse l'ADN extracellulaire du mucus et diminue ainsi la viscosité des expectorations des patients atteints de la CF. De la même manière, la nébulisation d'une solution saline hypertonique peut aider avant et pendant les techniques de dégagements des voies respiratoires et semble être un complément efficace à la physiothérapie. Enfin, un polyol naturel (un sucre-alcool), le mannitol, largement utilisé comme un agent osmotique, a été utilisé pour l'amélioration de la clairance mucociliaire. Sans avoir un mécanisme d'action définit, le Bronchitol® facilite l'osmose une fois inhalé et permettrait d'induire un afflux de liquide dans les sécrétions des voies aériennes pulmonaires rendant le mucus moins visqueux. Le Bronchitol® est un médicament qui contient le principe actif mannitol et représente un complément thérapeutique intéressant pour l'expectoration des sécrétions purulentes des patients CF. D'autres molécules sont en essai clinique et pourraient représenter des traitements thérapeutiques futurs parmi lesquels se trouvent l'OligoG. C'est un médicament proposé sous forme liquide, à utiliser avec un nébuliseur, diminuant l'épaisseur des sécrétions bronchiques et actuellement en essai clinique de phase 2. Enfin d'autres molécules actuellement en essai clinique de phase 1, comme ARO-ENaC et EDT002 pourraient représenter des stratégies thérapeutiques intéressantes.

3.3.2. *Approches thérapeutiques contre les infections bactériennes*

L'ECBC permet de confirmer la présence d'une infection bactérienne. Après caractérisation de la souche pathogène, un antibiogramme est réalisé afin d'évaluer la résistance aux antibiotiques testés pour adapter spécifiquement l'antibiothérapie. L'une des bactéries les plus pathogènes dans la CF est *Pseudomonas aeruginosa*. La colonisation par cette souche est associée à un déclin plus rapide de la fonction pulmonaire des patients CF (Emerson *et al.*, 2002). Par la récurrence des infections bactériennes, le développement de stratégies bactéricides pourrait retarder l'apparition des infections. Parmi ces stratégies se trouvent la tobramycine, un antibiotique de la famille des aminosides produit sous forme de poudre sèche (TOBI® PODHALER™, 28 mg) sous forme de traitement inhalé, rapide d'utilisation (antibiotique prêt à l'emploi) et pratique (inhalateur en format de poche) destiné aux patients CF. De plus, l'astréonam par nébuliseur, une β -lactamine monocyclique (Cayston®, 75 mg) est indiquée

dans le traitement des infections pulmonaires chroniques à *P.aeruginosa* des patients CF âgés de 6 ans et plus. Depuis, d'autres antibiotiques à inhaler sont en essai clinique de phase 3 comme la levofloxacin, antibiotique de la famille des quinolones (QuinsairTM) ou encore la colistine, antibiotique de la famille des polymyxines (Colifin[®]). D'autres stratégies sont également en cours de développement, comme l'oxyde nitrique (NO) inhalé (LungFitTM GO ; Thiolanox[®]), en essai clinique de phase 3, dont le but recherché est d'augmenter le niveau de NO pour améliorer l'élimination des bactéries et augmenter les fonctions pulmonaires des patients CF. Pour accélérer l'élimination des germes, le développement de futurs traitements à l'aide de bactériophages, actuellement en essai clinique de phase 2, ont permis d'observer, *in vitro*, une diminution de près de 80 % des souches à *Pseudomonas* issus d'isolats des patients CF (AP-PA02, Armata Pharmaceuticals ; BX004, BiomX).

3.3.3. Approches thérapeutiques anti-inflammatoires

Le contexte inflammatoire précoce présent au sein des voies respiratoires CF se retrouve accéléré par les infections répétitives, associées également à une infiltration massive des PNN. Les thérapies anti-inflammatoires mises en place pour les patients CF concernent uniquement l'ibuprofène, un anti-inflammatoire non-stéroïdien administré à forte dose pour atténuer la douleur et diminuer la fièvre (Konstan *et al.*, 1995). Bien que la thérapie à forte dose ne soit pas sans effets indésirables, les avantages de ce traitement semblent l'emporter sur les risques (Konstan, 2008; Mackey and Anbar, 2004). De nouvelles stratégies, actuellement à l'étude, s'appuient sur d'autres axes thérapeutiques comme des inhibiteurs d'enzymes associées à l'inflammation, ou encore des suppléments en acides aminés pour leur rôle protecteur face à l'infection. Parmi ces éléments, le brensocatib, un inhibiteur d'une enzyme activatrice des élastases des neutrophiles durant la maturation, la dipeptidyl peptidase-1 (DPP-1). Ce médicament permettrait de prolonger le délai avant la première exacerbation et réduirait leur fréquence chez les patients CF. Aujourd'hui, ce médicament fait l'objet d'un essai clinique de phase II sur des patients CF adultes puisqu'il permettrait de diminuer, en plus des exacerbations, l'inflammation pulmonaire. Toujours associé à l'inflammation et en essai clinique de phase II (APPLAUD) se trouve le fenretinide (LAU-7b). Les données actuelles semblent montrer une activité thérapeutique complémentaire à celle des modulateurs de la protéine CFTR, en favorisant le positionnement du canal Cl⁻ à l'intérieur des radeaux lipidiques, ce qui pourrait aider à réduire la réponse inflammatoire des poumons CF. Il existe également d'autres stratégies reposant sur une augmentation de l'arginine dans les poumons (CB-280, essai clinique de phase

I), élément essentiel pour augmenter le niveau de NO pulmonaire nécessaire pour combattre l'infection. De plus, le lonodelestat (POL6014), un composé actuellement en essai clinique de phase I, a été conçu pour bloquer la fonction de l'élastase des neutrophiles afin de minimiser la destruction des tissus et diminuer l'inflammation des voies respiratoires CF.

3.3.4. La transplantation pulmonaire

C'est le dernier recours pour les patients présentant une forme sévère de la maladie et cette option est envisagée lorsque le patient présente une insuffisance respiratoire terminale engageant le pronostic vital.

3.3.5. Les nouvelles approches thérapeutiques

3.3.5.1. Les thérapies géniques

La CF étant une maladie monogénique alors la communauté scientifique s'est orientée vers le développement de la thérapie du gène *CFTR* et de la protéine CFTR. Il existe de nombreuses approches à l'édition des gènes développées depuis ces vingt dernières années puisqu'elles peuvent se faire par l'utilisation de vecteurs viraux et non-viraux, par des ARNm de substitutions, par des endonucléases et par des oligonucléotides en remplaçant le gène muté en une copie parfaite du gène *CFTR*.

- Les nucléases à doigt de zinc, ou Zinc Finger Nucleases (ZFN) sont des protéines dites « à doigt de zinc » auxquelles est associée une nucléase, le plus souvent FokI (Flavobacterium okeanoikoites endonuclease I) (Kim *et al.*, 1996). La particularité de ces protéines est qu'elles incorporent un ou plusieurs ions de zinc. Le complexe formé par la protéine avec ces ions permet de reconnaître des séquences de trois nucléotides. De cette manière, il est possible de cibler des séquences génétiques, puis grâce à l'action de la nucléase associée de procéder à une coupure du brin d'ADN.

- Transcription activator-like effector nucleases (TALEN) est une méthode qui combine à la fois les propriétés de liaison à l'ADN des TALE (transcription activator-like effector) et le clivage de l'ADN par l'endonuclease FokI. La séquence protéique d'un TAL effector varie au niveau de deux acides aminés impliqués dans la reconnaissance spécifique d'un nucléotide particulier du génome. En conséquence, en combinant différents TAL effectors, le domaine de liaison à l'ADN des TALENs peut reconnaître une séquence génomique d'intérêt.

- CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) : cet outil dérive du système immunitaire bactérien en réponse aux infections virales et aux plasmides (CRISPR de type II). Cette technologie récente fait intervenir trois composants : un ARN guide de 20 nucléotides nécessaires pour le ciblage du gène d'intérêt (crRNA, *crispr RNA*), un tracrRNA (*trans-activating crRNA*) qui va s'associer au crRNA et l'endonucléase Cas9. De cette manière, le tracrRNA-crRNA forme une structure d'ARN qui dirige l'endonucléase Cas9 pour induire une double coupure du gène d'intérêt (Jinek *et al.*, 2012). Les cassures franches double brin induites sont réparées par jonction d'extrémité non homologue ou par recombinaison homologue, système permettant l'insertion des mutations ou d'édition du génome (Ceccaldi *et al.*, 2016; Lukacsovich *et al.*, 1994). Cette découverte scientifique a permis aux Professeures Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier d'être récompensées du Prix Nobel de Chimie 2020.

- L'édition des bases ou Base editing : cette une nouvelle approche utilise des composants du système CRISPR et permet de convertir directement et de manière irréversible, d'une paire de bases à une autre au sein d'une région cible, sans nécessiter de cassures d'ADN double brin, de processus de réparation dirigée par homologie (HDR) ou de modèles d'ADN donneur. De cette manière, il existe le *Cytosine base editors* (CBEs) permettant la conversion d'un C-G en T-A ou encore la *Adenine Base editors* (ABEs), qui est une conversion enzymatique A-T en G-C (Gaudelli *et al.*, 2017).

- L'édition primaire ou Prime editing : cette technique a été développée pour permettre à la fois des réactions de transition et de transversion, ainsi que des insertions et des délétions de jusqu'à 80 nucléotides sans qu'il soit nécessaire de générer des cassures double brin (Anzalone *et al.*, 2019). Sur le principe, une nickase Cas9 (nCAs9) est fusionné à une transcriptase inverse modifiée est utilisée pour générer un ADN complémentaire à partir d'une séquence d'ARN. Cette protéine de fusion est associée à un ARN guide (*prime editing guide-RNA*, pegRNA) qui oriente la nCas9 vers la séquence cible, ainsi qu'une seconde séquence qui va servir de matrice à l'édition de la séquence génomique souhaitée.

De cette manière, l'édition des bases pourrait alors constituer un nouvel outil intéressant pour le traitement de la CF, puisque de nombreux variants *CFTR* pourraient être corrigés par un simple changement de paire de bases. Récemment, l'utilisation de tels outils d'édition de bases, avec sécurité sur un modèle d'organoïde CF, a démontré son efficacité et sa faisabilité de contre la CF avec deux ABEs respectifs (Geurts *et al.*, 2020). La réparation génétique et

fonctionnelle a été obtenue dans les quatre cas, tandis que le séquençage du génome entier (WGS) des lignées corrigées de deux patients n'a pas détecté de mutations hors cible. De plus, de nouvelles stratégies thérapeutiques, en essai clinique de phase 1 et 2, sont actuellement à l'essai parmi lesquels se trouvent MRT5005 et 4D-710. Le MRT5005 est un nouveau médicament conçu pour restaurer la fonction CFTR en délivrant aux poumons des copies correctes de l'ARNm codant la protéine CFTR. L'administration de l'ARNm permettrait aux cellules pulmonaires de créer une protéine CFTR sauvage, à la bonne topologie, indépendamment de la mutation spécifique du gène *CFTR* d'une personne. Le 4D-710 est un vecteur de virus adéno-associé (AAV) personnalisé conçu pour délivrer un gène *CFTR* sain spécifiquement aux cellules des poumons des personnes atteintes de CF. Cela permettrait aux cellules pulmonaires de créer une protéine CFTR fonctionnant normalement, indépendamment de la mutation spécifique du gène *CFTR* d'une personne.

3.3.5.2. Les thérapies protéiques

Les thérapies de la protéine CFTR mutée visent à rétablir autant que possible sa localisation à la membrane plasmique en plus de participer à la formation et sa fonction canal chlorure au niveau de l'épithélium. Les modulateurs de CFTR constituent un groupe spécialisé de molécules thérapeutiques qui s'attaquent à la cause sous-jacente du dysfonctionnement de la protéine CFTR. Parmi ces modulateurs se trouvent des correcteurs (Lumacaftor, Tezacaftor et Elexacaftor), des potentiateurs (Ivacaftor), des stabilisateurs (Cavosonstat) ou encore des translecteurs (ELX-02) (**Figure 18 ►**) (Lee *et al.*, 2021).

3.3.5.2.1. Les correcteurs de CFTR

Les correcteurs sont des molécules capables de corriger les anomalies de la protéine CFTR et de la rendre disponible à la surface de l'épithélium. Trois correcteurs ont été développés par Vertex Pharmaceuticals : Lumacaftor, Tezacaftor et Elexacaftor. Lumacaftor (VX-809) est un médicament administré pour les mutations de classes II en prenant en compte un défaut de repliement de la protéine CFTR conduisant à sa dégradation. En favorisant le bon repliement de la protéine et en évitant sa dégradation, Lumacaftor augmente la maturation de la protéine CFTR ainsi que son expression à la membrane plasmique (Van Goor *et al.*, 2011). Cependant, elle ne semble pas influencer sur la sécrétion des ions Cl⁻ dans la sueur ou de variation du VEMS chez les patients F508del homozygotes (Clancy *et al.*, 2012) (NCT00865904). Tezacaftor (VX-661) possède une structure similaire au Lumacaftor. Sa fonction est de corriger le positionnement de la protéine CFTR à la surface de la cellule pour permettre la formation

d'un canal adéquat et améliorer la circulation de l'eau et des sels à travers la membrane cellulaire (Sala and Jain, 2018). Enfin, Elexacaftor (VX-445) améliore la maturation et le trafic de la protéine CFTR mutée.

3.3.5.2.2. *Le potentiateur de CFTR*

Cette stratégie thérapeutique repose avant tout sur l'étude *in silico* de la structure tridimensionnelle de CFTR pour mettre au point des potentiateurs qui vont augmenter la fonction résiduelle de CFTR. Parmi eux se trouvent Ivacaftor (VX-770, Kalydeco®) qui a été le premier potentiateur de la conductance en Cl⁻ via un mécanisme ATP-indépendant non conventionnel (Eckford *et al.*, 2012). Il cible la cause sous-jacente de la CF, à savoir la protéine CFTR défectueuse. Il facilite l'ouverture du canal CFTR à la surface de la cellule pour permettre au chlorure et au sodium d'entrer et de sortir de la cellule. Lors des essais cliniques, les patients CF ont montré une amélioration de leur fonction pulmonaire, une diminution des exacerbations pulmonaires, une prise de poids et enfin une qualité de vie améliorée. Initialement développé pour la mutation G551D (mutation de classe III ; Gly551Asp), ce traitement peut être administré pour les classes II à VI en fonction des mutations (Cheng *et al.*, 2019; Moss *et al.*, 2015; Ramsey *et al.*, 2011; Van Goor *et al.*, 2014).

3.3.5.2.3. *Les stabilisateurs de CFTR*

Ces molécules ont pour rôle d'augmenter l'expression et la durée de localisation à la membrane de CFTR (Clancy *et al.*, 2019). Le Cavosonstat (N91115, Nivalis) est un nouveau modulateur de CFTR (Donaldson *et al.*, 2017). Il est proposé pour augmenter la stabilité de CFTR en réduisant la dégradation associée au réticulum endoplasmique (RE) et en prolongeant la durée de localisation de CFTR dans la membrane cellulaire. Le Cavosonstat exerce ses effets sur la fonction de CFTR F508del par le biais d'une inhibition de la S-nitrosoglutathione réductase (GSNOR) et la préservation subséquente du S-nitrosoglutathion (GSNO), le S-nitrosothiol (SNO) de faible poids moléculaire le plus abondant. Dans une étude de phase 2 sur le Cavosonstat en association avec l'Ivacaftor, le cavosonstat n'a pas démontré de bénéfice dans le critère principal de l'étude, à savoir la modification de la fonction pulmonaire (NCT02275936, NCT02013388, NCT02500667).

3.3.5.2.4. Les amplificateurs de CFTR

Les amplificateurs permettent uniquement d'augmenter la quantité des variants de CFTR disponibles à la membrane en vue d'augmenter son activité par d'autres modulateurs de CFTR comme les correcteurs et potentiateurs. Parmi ces amplificateurs se trouvent le Nesolicaftor (PTI-428). Un essai clinique de phase II a été conduit pour tester la sécurité et efficacité de ce composé seul ou en combinaison avec deux autres modulateurs de CFTR, Posenacaftor (PTI-801) et Dirocaftor (PTI-808). Le Nesolicaftor n'a pas réussi à augmenter le sauvetage des protéines CFTR mutées G542X-CFTR ou de W1282X-CFTR (mutation de classe I). En revanche, son efficacité dans les cellules CFBE41o exprimant la protéine CFTR avec la mutation F508del a permis d'améliorer le sauvetage par le VX-809 de manière synergique. Il s'est montré efficace pour augmenter la fonction de CFTR ainsi que son activité associée aux canaux ENaC et TMEM16A dans les cellules épithéliales bronchiques primaires (Venturini *et al.*, 2021).

3.3.5.2.5. Les inducteurs de « translecture »

Les inducteurs de « translecture » sont des agents de lecture des codons stop prématurés (*premature termination codon*, PTC) qui suppriment les PTCs, produisent une lecture traductionnelle par le ribosome et une protéine complète subséquente. Parmi ces inducteurs se trouvent l'Ataluren et le ELX-02. L'Ataluren (TranslarnaTM; PTC-124, PTC Therapeutics®) entraîne la poursuite de la traduction au-delà du codon stop prématuré et l'amélioration du transport des ions Cl⁻ au niveau de l'épithélium nasal des patients. Malgré cette innovation, l'Ataluren ne semble pas améliorer la fonction pulmonaire des patients CF et l'essai clinique a été interrompu. Ce traitement aurait pu représenter une stratégie intéressante pour les mutations de classe I caractérisées par la présence d'un codon stop prématuré aboutissant à la production d'une protéine tronquée. Malgré tout, d'autres agents de translecture ont montré des résultats intéressants parmi lesquels se trouvent ELX-02 (Eloxx Pharmaceuticals). Effectivement, ELX-02 est un composé conçu pour restaurer la fonction CFTR chez les patients CF présentant des mutations non-sens G542X (c.1624G>T; mutation de classe I) (Crawford *et al.*, 2021). ELX-02 est destiné à permettre aux cellules pulmonaires de passer le codon stop prématuré et de produire une protéine CFTR fonctionnelle de pleine longueur. Une étude de phase 2 visant à tester la sécurité et la tolérance d'ELX-02 est en cours. L'étude est réalisée sur des patients CF qui possèdent au moins une copie de la mutation CFTR (G542X).

3.3.5.2.6. Thérapies protéiques combinées

L'efficacité des différents potentiateurs et correcteurs de CFTR ont permis de développer des thérapies protéiques combinées parmi lesquelles se trouvent le Trikafta[®], l'Orkambi[®] ou encore le Symdeko[®] (**Tableau 3 ▼**).

Le Trikafta[®]

Le Trikafta[®] est une thérapie combinée de trois modulateurs. L'elixacaftor (VX-445) et le tezacaftor (VX-661) sont des correcteurs de CFTR, un type de modulateur conçu pour fixer la protéines CFTR défectueuse afin d'avoir un adressage de la protéine au bon endroit. L'ivacaftor est un potentiateur. Une fois la protéine à la surface, les potentiateurs vont faciliter l'ouverture du canal chlorure pour permettre aux ions Cl⁻ et Na⁺ d'entrer et de sortir de la cellule. Ce médicament est approuvé pour les adultes et les enfants de 12 ans et plus avec au moins une mutation F508del ou l'une des 177 autres mutations approuvées par la FDA. Trikafta[®] a également été associé à des améliorations significatives du chlorure de la sueur, des exacerbations pulmonaires et de la qualité de vie.

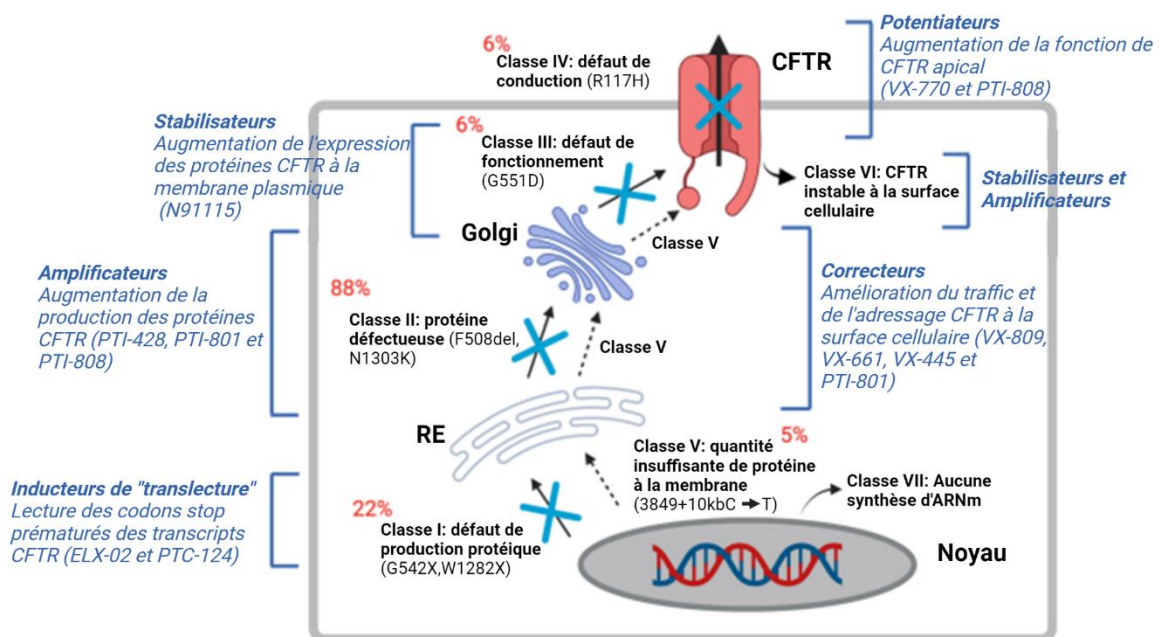


Figure 18: impacts des modulateurs de CFTR sur les différents variants de CFTR (modifié d'après Lee et al, 2021).

L'Orkambi®

L'Orkambi® est une thérapie combinée associant le lumacaftor (VX-809), qui est conçu pour adresser la protéine CFTR défectueuse à la surface des cellules, et l'ivacaftor (VX-770), qui contribue à améliorer la fonction de la protéine en tant que canal chlorure à la surface des cellules. Une étude de phase 3 d'Orkambi® chez les enfants âgés de 12 mois à 24 mois est en cours.

Le Symdeko®

Le Symdeko® est une thérapie combinée associant le tezacaftor (VX-661), un composé conçu pour déplacer la protéine CFTR défectueuse au bon endroit à la surface des cellules des voies respiratoires, et l'ivacaftor (VX-770), qui contribue à faciliter l'ouverture du canal chlorure à la surface des cellules pour permettre au chlorure et au sodium d'entrer et de sortir de la cellule. Une étude de phase 2 pour les patients CF qui ont deux copies de la mutation F508del a été achevée en janvier 2015. Elle a notamment permis de mettre en évidence un composé efficace et bien toléré pendant une période de 120 jours et également de confirmer un effet bénéfique de cette thérapie par un ralentissement du déclin des fonctions pulmonaires (Flume *et al.*, 2021). Deux études de phase 3 du tezacaftor en association avec l'ivacaftor ont montré des résultats positifs en 2017. L'essai EVOLVE s'adressait aux patients CF F508del homozygotes et a démontré une amélioration de la fonction respiratoire avec un gain de 4 points de pourcentage du VEMS des patients traités durant 24 semaines (Taylor-Cousar *et al.*, 2017) (NCT02347657). En revanche, l'essai EXPAND a été réalisé sur des patients CF possédant une mutation F508del ainsi qu'une mutation résiduelle puis traités soit par le tezacaftor-ivacaftor, soit par l'ivacaftor seul ou soit le placebo. Une amélioration de la valeur prédictive du VEMS de 6,8 points de pourcentage et de 4 points de pourcentage a été observée respectivement pour le traitement combiné tezacaftor-ivacaftor et ivacaftor seul par comparaison au placebo (Rowe *et al.*, 2017).

Classification traditionnelle	CLASSE I		CLASSE II	CLASSE III	CLASSE IV	CLASSE V	CLASSE VI
Classification de Marson, Bertuzzo et Ribeiro	CLASSE IA	CLASSE IB	CLASSE II	CLASSE III	CLASSE IV	CLASSE V	CLASSE VI
Classification De Boeck et Amaral	CLASSE VII	CLASSE I	CLASSE II	CLASSE III	CLASSE IV	CLASSE V	CLASSE VI
Défaut de CFTR	Aucun ARNm	Aucune fonction protéique	Aucun acheminement de protéine	Protéine non fonctionnelle	Diminution de la conductance du canal	Synthèse protéique réduite	Diminution de la stabilité de la protéine
Mutations spécifiques	Dele2,3(21kb), 1717-1G → A	Gly542X, Trp1282X	Phe508del, Asn1303Lys, Ala561GLu	Gly551Asp, Ser549Arg, Gly1349Asp	Arg117His, Arg334Trp, Ala455Glu	Ala455Glu, 3272-26A → G, 3849+10 kg C → T	c.120del23, rPhe508del
Stratégies thérapeutiques	Incurable	Synthèse protéique	Acheminement protéique	Rétablir l'activité du canal	Rétablir l'activité du canal	Repliement correcte	Augmenter la stabilité de la protéine
Traitements	Aucun	Aucun	Lumacaftor-Ivacaftor, Tezacaftor-Ivacaftor	Ivacaftor	Ivacaftor (certaines mutations)	Tezacaftor-Ivacaftor (certaines mutations)	Tezacaftor-Ivacaftor (certaines mutations)

Tableau 3: stratégies thérapeutiques et traitements associés aux variants CFTR

CHAPITRE 3 : INFLAMMATION PULMONAIRE

Chapitre 3: Inflammation pulmonaire

La présence de pathogènes ou d'allergènes au sein des voies aériennes engage la première ligne de défense représentée par les cellules épithéliales pulmonaires. Cette première alerte déclenche une réponse immunitaire immédiate en sollicitant, dans un premier temps, l'immunité innée puis acquise. L'immunité innée intervient en induisant une réaction inflammatoire via les cellules immunitaires telles que les polynucléaires neutrophiles (PNN), les cellules dendritiques et les macrophages. Elle peut être un phénomène précoce initié dès le plus jeune âge, sans qu'aucun agent infectieux ne soit isolé, laissant supposer qu'elle peut être initiée par des phénomènes non-infectieux (Delacourt, 2003; Zahm *et al.*, 1997). L'inflammation peut être également déclenchée par une atteinte pulmonaire progressive en lien avec une infection chronique des voies aériennes. Une étude comparant des enfants CF versus non-CF a montré que pour une même charge bactérienne dans les voies aériennes, l'inflammation est plus marquée chez les enfants CF (Khan *et al.*, 1995; Muhlebach *et al.*, 1999). L'inflammation reste cependant plus marquée chez des nourrissons CF infectés que chez des nourrissons CF non-infectés (Dakin *et al.*, 2002).

1. Les médiateurs de l'inflammation

Dans les conditions physiologiques, les voies aériennes sont nettoyées des bactéries par la clairance mucociliaire. En revanche, dans des conditions pathologiques et notamment associées à la CF, la présence de bactéries est détectée, qui interagissent via des motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen-associated molecular pattern, PAMP) avec des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptor, PRR) exprimés à la surface des cellules immunitaires ou épithéliales. Les PRR comprennent les récepteurs TLR (Toll-like receptors) associés à la membrane, les récepteurs NLR (Nod-like receptors) cytoplasmiques et les récepteurs RLR cytoplasmiques (retinoic acid inducible gene I-like helicase receptors). Dix TLRs, 23 NLRs et 3 RLRs ont été identifiés chez l'homme, avec seulement un sous-ensemble de membres bien caractérisés de la famille NLR (NALP1, NALP3, NOD1, NOD2 et IPAF) et RLR (RIG-1 et MDA5). Les PAMPs sont des motifs spécifiques, conservés qui peuvent être des protéines, des acides nucléiques, des lipides et des glucides microbiens. Les PRR sont également capables de détecter des signaux de danger (Danger-Associated Molecular Pattern, DAMP). Ces signaux peuvent être nucléaires, cytoplasmiques, mitochondriaux ou encore issus du réticulum endoplasmique. Dans le tableau 4 ci-dessous est présentée une liste non exhaustive de différents PRR en association avec leur PAMP/DAMP.

Pattern recognition receptors	Ligands (PAMP/DAMP)
Toll-like receptors	
TLR1, TLR2, TLR6	Lipopeptides bactériens
TLR4	LPS, LMW-HA
TLR5	Flagelline bactérienne
TLR3	ARN double brins
TLR7, TLR8	ARN simple brin
TLR9	ADN
TLR10	inconnus
NODs	
NOD1, NOD2	Peptidoglycanes
Nod-like receptors	
NLRP-1	Dipeptide muramyl, peptidoglycanes
NLRP-3	ARN viraux, acide urique, ATP
NLRC4	Flagelline
CLRs	
Dectine-1	β -glycanes fongiques
Mincle	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
RLRs	
RIG-I	ARN viraux
MDA5	ARN viraux
LGP2	ARN viraux

Tableau 4: principaux récepteurs de reconnaissances de motifs moléculaires de l'immunité innée et exemples de leurs ligands (PAMP/DAMP) (modifié d'après Sheldon et al, 2016).

En fonction de la nature de l'effecteur, les cellules « sentinelles » du système immunitaire résidant dans les tissus (neutrophiles, macrophages, mastocytes, cellules dendritiques) vont sécréter des médiateurs de l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires, chimiokines, histamines, dérivés lipidiques) nécessaires à l'activation des cellules endothéliales et à l'attraction des cellules immunitaires. Cette étape participe également à la transmigration et donc au recrutement de cellules immunitaires au niveau du foyer inflammatoire.

2. Les polynucléaires neutrophiles dans la CF

Les PNN sont des leucocytes jouant un rôle majeur dans le système immunitaire. Ils peuvent représenter jusqu'à 60 % des leucocytes humains circulants avec une durée de vie courte (\pm 12 heures). Leur principale fonction est microbiocide en participant directement à la phagocytose des microorganismes. Cette activité est renforcée par la dégranulation et la libération de ROS ainsi que la sécrétion de chimiokines (IL-8, IP-10, MIP-1 α) et de cytokines

(TNF- α , CXC, IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13). Les PNN sont capables de contrôler la croissance bactérienne, avec la libération des ROS mais également par la sécrétion des protéases, hydrolases et des défensines. Ils synthétisent d'autres médiateurs parmi lesquels nous pouvons citer des cytokines anti-inflammatoires (IL-1RA, TGF- β), des facteurs de croissance (G-CSF, GM-CSF) et des facteurs fibrogéniques et angiogéniques (TGF- α , HFG et VEGF) (Cassatella, 1999).

Les récepteurs de surface cellulaire des PNN sont capables de détecter des gradients chimiques de molécules telles que l'interleukine-8 (IL-8), l'interféron-gamma (IFN- γ) et l'anaphylatoxine C5a. Dans le poumon, le chimioattractant majoritairement impliqué dans la migration et l'infiltration des PNN est l'IL-8 (CXCL-8) (Leonard and Yoshimura, 1990; Kunkel *et al.*, 1991; Inoue, 1999; Cassatella, 1999).

Les infections bactériennes chroniques causent des dommages irréversibles au niveau des poumons CF. De plus, l'inflammation dans la CF est majoritairement influencée par l'afflux abondant des PNN vers la surface de l'épithélium des voies aériennes. L'élastase du neutrophile (NE, Neutrophil Elastase) libérée induit une surexpression des mucines MUC-5AC (Ye *et al.*, 2019) et augmente la sécrétion de l'IL-8 par les cellules épithéliales (Devaney *et al.*, 2003). L'IL-8 augmente également la libération de NE des neutrophiles ce qui entraîne une inflammation auto-entretenu des neutrophiles et un excès de NE dans l'ASL (Taggart *et al.*, 2000). L'activité protéolytique de la NE clive les récepteurs CXCR1 (C-X-C motif chemokine Receptor-1), récepteurs de l'IL-8 présent à la surface des PNN. Les fragments de CXCR1 stimulent la production d'IL-8 par les cellules épithéliales. De cette manière, la réponse inflammatoire induite par les PNN reste maintenue dans les voies aériennes (Hartl *et al.*, 2007).

Les enfants CF présentent une inflammation neutrophilique des voies aériennes mais qui, dans les premiers temps, peut être sans infection bactérienne détectée (Khan *et al.*, 2019). Les médiateurs lipidiques, les cytokines inflammatoires et les différents signaux pathogènes font évoluer l'inflammation, avec apparition d'une NETose conduisant à un mucus encore plus visqueux (Nichols and Chmiel, 2015). De plus, la réponse immunitaire exagérée génère au sein des voies respiratoires des patients CF, la présence d'un stress oxydatif qui accentue la dégradation pulmonaire menant à la bronchectasie (Cohen-Cymbarknoh *et al.*, 2013) (**Figure 19 ►**). Chez les patients CF présentant des variants sévères de CFTR (par exemple, F508del et G551D), les PNN possèdent une survie prolongée et une diminution de la phagocytose et de la dégranulation (Gray *et al.*, 2018).

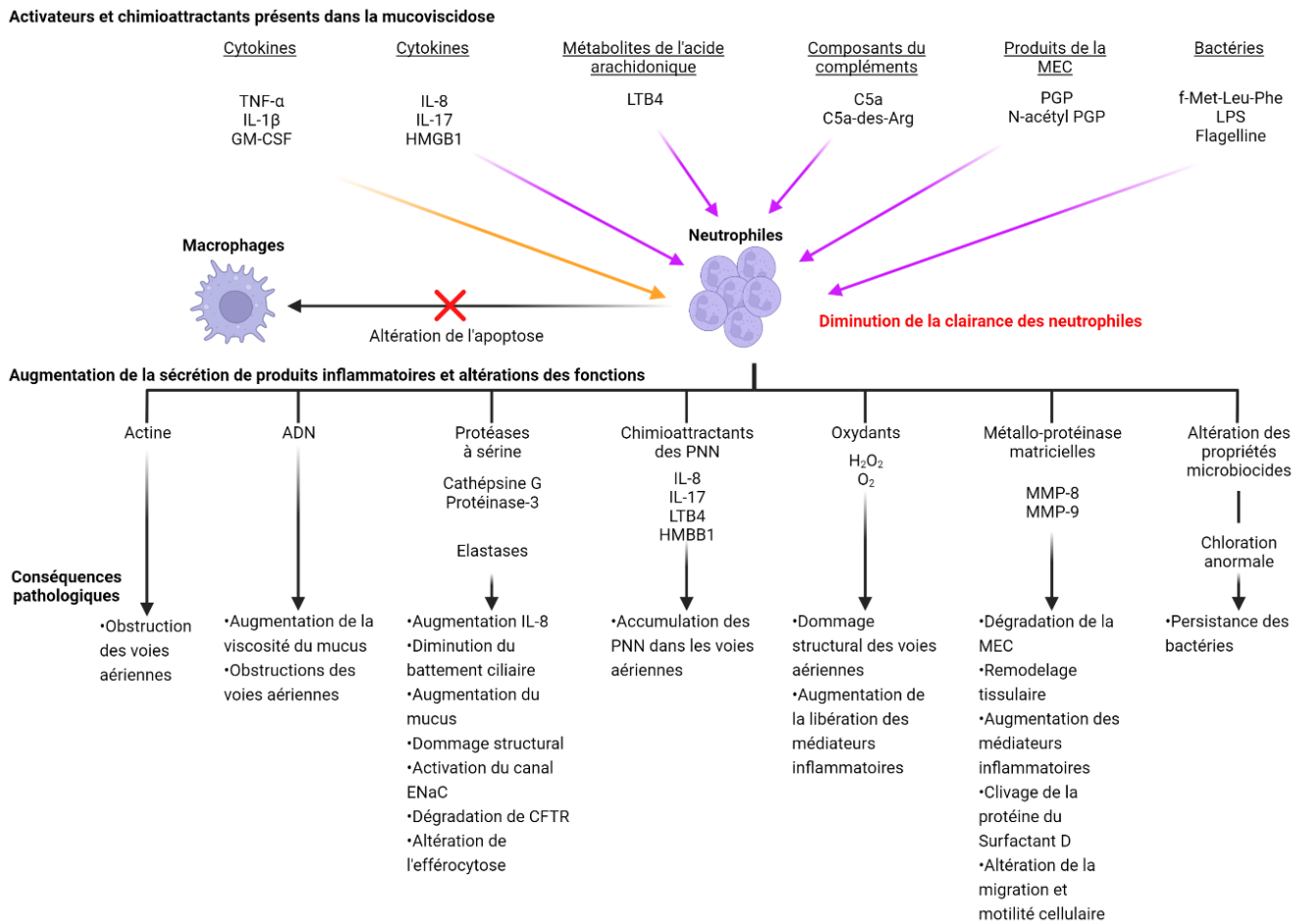


Figure 19: modèle d'inflammation neutrophilique CF (modifiée d'après Nichols et al, 2015).

3. Les macrophages dans la CF

Le rôle des macrophages a été largement négligé dans la physiopathologie de la CF, l'accent étant mis sur les neutrophiles et les cellules épithéliales. Cependant, la dérégulation des macrophages pourrait nuire à la résolution de l'inflammation en raison d'une incapacité à agir comme une cellule suppressive, entraînant alors une inflammation/infection chronique. Certaines études ont suggéré que les propriétés altérées des cellules immunitaires CF pourraient contribuer à la mise en place d'une l'inflammation pulmonaire incontrôlée. Des études s'intéressant aux macrophages alvéolaires issus de patients CF ont mis en évidence une fonction de phagocytose réduite pour *E. coli* comparée à une population de macrophages témoins non-CF (Simonin-Le Jeune et al., 2013). De plus, le pourcentage de *P.aeruginosa* vivantes intracellulaires a été comparé entre des macrophages de patients CF et non-CF. Les résultats ont permis également de mettre en évidence un défaut d'activité bactéricide des macrophages

CF (Del Porto *et al.*, 2011). En outre, les LBA des souris *CFTR*^{-/-} présentent, en réponse au LPS de *P. aeruginosa*, des concentrations significativement plus élevées de cytokines pro-inflammatoires libérées par les macrophages (IL-1 α , IL-6, G-CSF et IL-8) que les LBA des souris sauvages (Bruscia *et al.*, 2009). Dans la CF, le stress du réticulum endoplasmique induit l'activation de IRE1 α conduisant à une augmentation de l'expression de XBP1s. Cette voie IRE1 α /XBP1 de l'UPR (Unfolded Protein Response) dans le réticulum endoplasmique est responsable de l'augmentation de la production et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire par les macrophages alvéolaires des patients CF (Hull-Ryde *et al.*, 2021; Lubamba, 2017) et pourrait donc représenter une voie thérapeutique intéressante dans le cadre de la CF.

4. Le déséquilibre des cytokines inflammatoires

La mise en place de la réponse immunitaire et inflammatoire passe par l'équilibre entre les cytokines pro-/anti-inflammatoires. Dans la CF, l'analyse des expectorations de patients CF permettent de visualiser leur statut inflammatoire à travers la quantification de ces biomarqueurs. Cet équilibre se retrouve perturbé avec notamment une augmentation significative de l'IL-8, du TNF- α , de l'IL-1 β , de l'IL-6 et une diminution significative de l'IL-10.

4.1. L'interleukine 8

L'IL-8 est une chimiokine produite principalement par les PNNs, les macrophages et les cellules épithéliales pulmonaires en réponse à des stimuli infectieux et inflammatoires. Elle présente un chimiotactisme pour les PNN, les lymphocytes T et les basophiles (Dean *et al.*, 1993). Des études ont également montré que l'IL-8 possède d'autres effets immunomodulateurs, notamment la capacité d'induire l'expression de la métalloprotéinase-9 matricielle (MMP-9), de libérer du TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) et d'amorcer le métabolisme oxydatif des neutrophiles (Kobayashi, 2008). Dans la CF, les taux élevés d'IL-8 dans les crachats de patients CF ainsi que le contexte pro-inflammatoire avec le recrutement massif des PNN, pourraient refléter une sécrétion constitutive d'IL-8 par les cellules épithéliales bronchiques CF (Tabary *et al.*, 1999, 1998).

4.2. L'interleukine-1 β

L'interleukine-1 β (IL-1 β) est un médiateur inflammatoire majeur lors d'atteintes pulmonaires, impliquée dans le recrutement de cellules effectrices inflammatoires et l'induction de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et IL-8 dans de nombreux types cellulaires incluant les macrophages et les cellules épithéliales. Des études antérieures confirment le rôle de l'IL-1 β dans la pathogenèse de la CF. Les niveaux d'IL-1 β sont augmentés dans les LBA des patients CF en présence d'un contexte infectieux (Armstrong *et al.*, 2005; Bonfield *et al.*, 1995; Osika *et al.*, 1999). Cette augmentation a été associée dans le temps à une infection par *P.aeruginosa* (Douglas *et al.*, 2009). D'autres part, le polymorphisme du gène de l'IL-1 β peut être également associé à divers degrés de gravité de la maladie chez les patients CF (Levy *et al.*, 2009).

4.3. Le facteur de nécrose tumorale- α

Le facteur de nécrose tumorale- α ou Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) est une cytokine pro-inflammatoire. Il possède de nombreux rôles puisqu'il peut conduire à l'apoptose des cellules cibles ou à l'inverse permettre la survie cellulaire. Il est majoritairement produit par les macrophages mais également par les cellules épithéliales et les cellules T CD4⁺. Le TNF- α fait partie des biomarqueurs CF fréquemment évalués qui pourrait être suivi dans le cadre d'essais cliniques dans la CF (Lepissier *et al.*, 2021). L'analyse des crachats a permis de mesurer le taux de TNF- α qui était significativement augmenté pour le groupe CF en comparaison d'un groupe témoin (Osika *et al.*, 1999).

4.4. L'interleukine-6

L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine pro-inflammatoire de l'immunité innée. Elle joue un rôle clé sur les cellules de l'immunité, dans la régulation de l'inflammation aiguë et de l'inflammation chronique. L'hypersécrétion d'IL-6 et de son récepteur IL-6R induisent l'inflammation à la suite d'une infection ou d'une lésion tissulaire. L'IL-6 est également capable d'induire la différenciation des cellules T CD8⁺ en cellules T cytotoxiques (Okada *et al.*, 1988). L'évaluation de l'inflammation a permis de constater une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'IL-6 dans la CF à l'état basal (Fayon *et al.*, 2008). En outre, dans les LBA d'enfants CF infectés, la concentration en IL-6 est significativement supérieure à celle des LBA non-CF ou CF non-infectés (Armstrong *et al.*, 2005).

4.5. Les leukotriènes

Dans les expectorations et les LBA des patients CF sont retrouvés des taux élevés d'eicosanoïdes (Konstan *et al.*, 1993). De tous les eicosanoïdes présents dans les voies respiratoires, les leukotriènes B₄ (LTB₄) sont les chimioattractants les plus puissants des neutrophiles. Les LTB₄ dérivés des neutrophiles contribuent probablement au recrutement de neutrophiles supplémentaires (Ford-Hutchinson *et al.*, 1980). Les produits des neutrophiles, comme la NE, peuvent également contribuer à la charge chimiotactique des LTB₄ en stimulant les macrophages alvéolaires à libérer également des LTB₄ (Hubbard *et al.*, 1991).

4.6. L'interleukine-10

L'interleukine-10 est une cytokine anti-inflammatoire dont le principal rôle est de diminuer l'inflammation médiée par les macrophages et les lymphocytes T (Th1). Il a été proposé que la régulation négative de la production d'IL-10 chez les patients CF pourrait représenter un événement critique dans la réponse inflammatoire excessive des voies respiratoires. En effet, il a été démontré que les sécrétions pulmonaires contenaient moins d'IL-10 que celles des sujets témoins (Bonfield *et al.*, 1995b). Bonfield *et al.* ont également montré que les cellules épithéliales bronchiques normales produisaient de manière constitutive IL-10 et que cette expression était diminuée dans les cellules CF (Bonfield *et al.*, 1995a).

La plupart des patients CF présentent des infections polymicrobiennes mais *P. aeruginosa* reste le micro-organisme le plus fréquemment cultivé dans les fluides pulmonaires CF. L'infection bactérienne déclenche une réponse inflammatoire vigoureuse (**Figure 20 ►**). Cette réponse dans la CF a permis de mettre en évidence l'implication de différents récepteurs de surfaces cellulaires (PRR) nécessaires au déclenchement des cascades associées à l'inflammation parmi lesquelles se trouvent les voies NF- κ B, MAPK et AP-1. Cette réponse initiée par les cellules épithéliales et les PNN permet notamment de sécréter de nombreux médiateurs représentés par des cytokines (TNF- α , IL-6) et des chimiokines (IL-8), ainsi que des protéases (NE), des ROS et des composés lipidiques (LTB₄). Bien que les PNN et les cellules épithéliales aient été les plus étudiés, de nombreuses autres cellules, notamment les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T, les lymphocytes B participent activement à la réponse inflammatoire de l'hôte dans la CF. L'ensemble de ce contexte permet notamment d'observer la différenciation des cellules Th17 en PNN, ce qui pourrait concourir à l'accumulation de ces cellules dans la CF. De plus, les cellules musculaires lisses des voies

respiratoires produisent également des médiateurs inflammatoires nécessaires à la mise en place de la phase vasculaire de l'inflammation, en diminuant notamment leurs protéines de jonction intercellulaire (PECAM-1, VE-cadherine) nécessaires à la transmigration des cellules immunitaires (Bui *et al.*, 2012; Nichols and Chmiel, 2015).

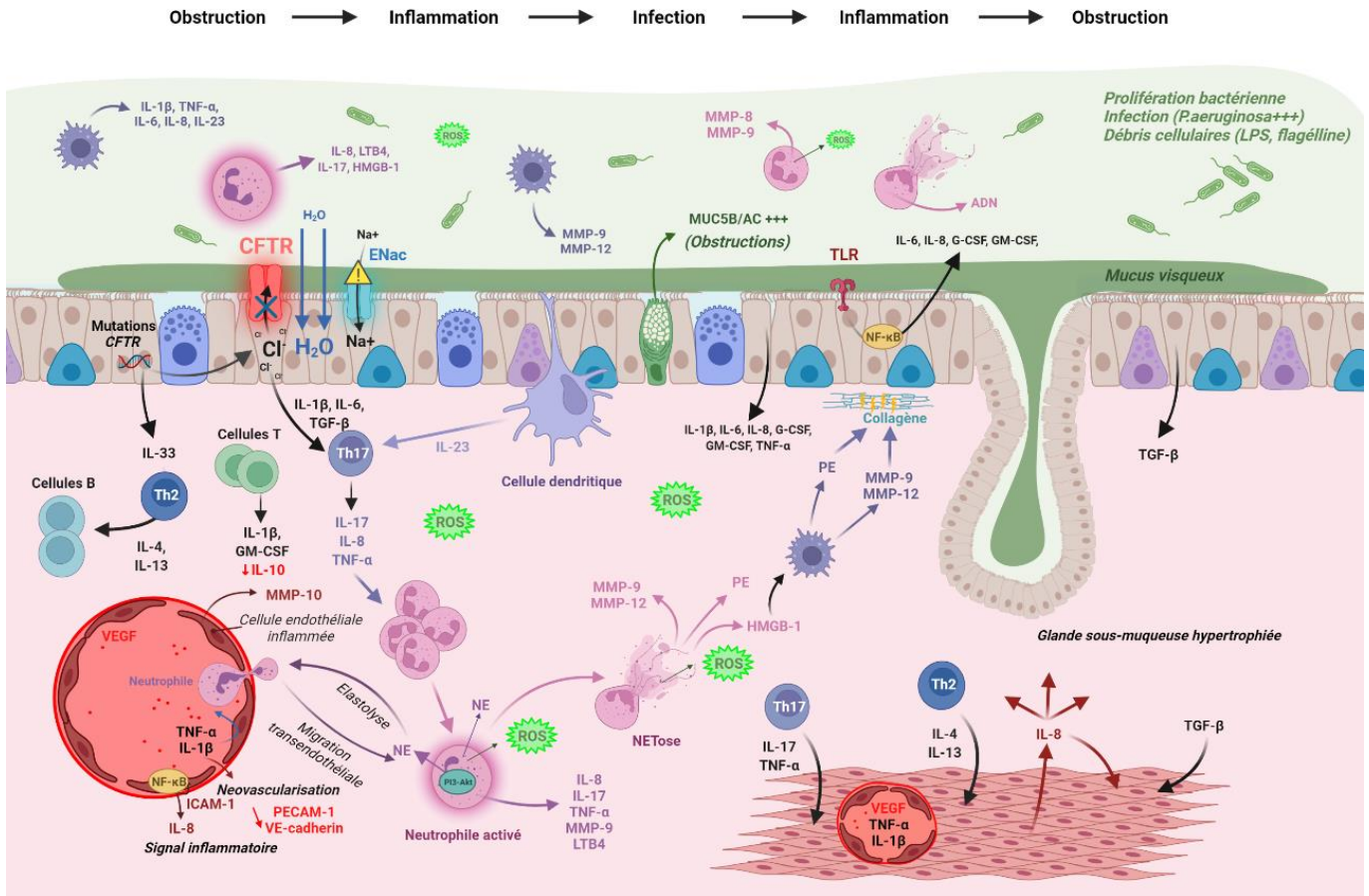


Figure 20: vue simplifiée de la réponse inflammatoire des voies respiratoires dans la CF (modifiée d'après Nichols *et al.*, 2015 ; et Bui *et al.*, 2012).

Abréviations : CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Receptor ; ENaC, Epithelial Na⁺ Channel ; G-CSF, Granulocyte-Colony Stimulating Factor ; GM-CSF, Granulocyte-macrophage Colony-Stimulating Factor ; ICAM, molécule d'adhésion intercellulaire ; IL, interleukine ; LTB4, leukotriène B4 ; MMP, métalloprotéinase matricielle ; MUC, mucines ; NE : Neutrophil Elastase PE, Prolyl endopeptidase ; ROS, reactive oxygen species ; TGF, Transforming Growth Factor ; TLR, Toll-Like Receptor ; TNF, Tumor Necrosis Factor ; VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor.

CHAPITRE 4 : ACIDE HYALURONIQUE

Chapitre 4 : Acide Hyaluronique

1. Structure de l'Acide Hyaluronique

L'acide hyaluronique (AH) a été découvert pour la première fois au département d'ophtalmologie de l'université Columbia de New York en 1934, dans l'humeur vitrée de bœuf. Plus tard, il fut découvert dans divers tissus et fluides de vertébrés ainsi que chez l'homme. Il s'agit d'un glycosaminoglycane (GAG), retrouvé sous forme de longues chaînes linéaires composées d'unités répétitives dissaccharidiques composées d'acide glucuronique et de glucosamine, liées entre elles par des liaisons glycosidiques alternées $\beta 1,3$ et $\beta 1,4$ [-D-acide glucuronique- $\beta 1,3$ -N-acétyl-D-glucosamine- $\beta 1,4$ -] $_n$ (**Figure 21 ▼**). La présence de multiples charges négatives permet à l'AH d'exister sous forme acide ou sous forme de sel, principalement de sodium (hyaluronate de sodium). Contrairement aux autres GAG, l'AH est la seule chaîne polysaccharidique non sulfatée qui peut atteindre un poids moléculaire de 10^7 Da et une taille d'environ $25 \mu\text{m}$.

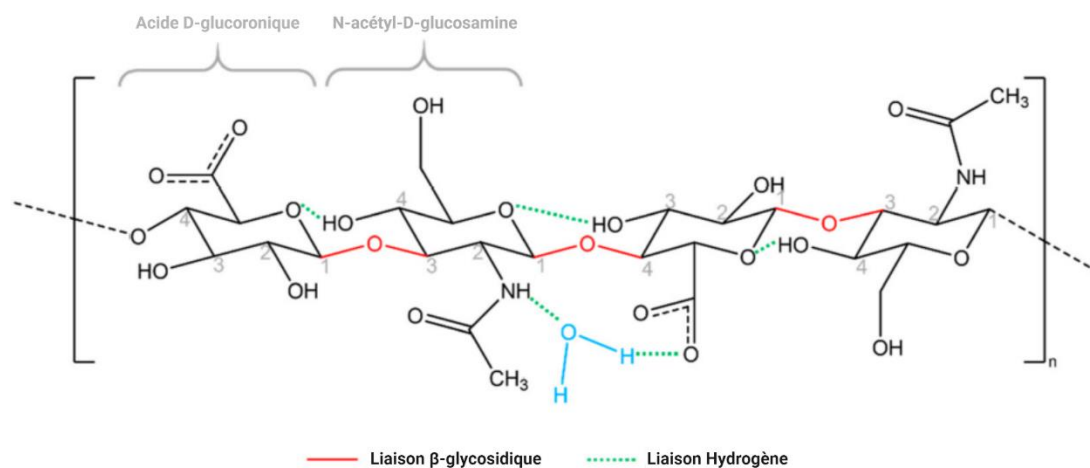


Figure 21: structure chimique de l'acide hyaluronique (d'après Marinho, 2021)

2. Caractéristiques physico-chimiques de l'AH

La principale propriété de l'AH est sa grande affinité pour l'eau. Sa topologie linéaire non ramifiée lui donne la possibilité d'absorber jusqu'à mille fois son poids en eau. Ainsi, l'AH possède une texture gélifiée très recherchée pour traiter de nombreuses maladies inflammatoires chroniques, comme les douleurs articulaires ou l'arthrite rhumatoïde. L'AH possède également une viscoélasticité importante (Kobayashi *et al.*, 1994). Chaque molécule d'AH possède une partie terminale hydrophile et une partie terminale hydrophobe, et grâce aux pôles complémentaires, les molécules d'AH s'assemblent pour former un réseau de polymère. Ces

caractéristiques permettent donc de former un gel doté de propriétés viscoélastiques importantes pour un rôle dans le renforcement de la matrice extracellulaire (Gall, 2010). Au niveau des bourses synoviales des articulations, ce gel agirait comme un lubrifiant et un amortisseur des structures articulaires et tendineuses (Tamer, 2013). Ces propriétés rhéologiques facilitent en outre la prolifération et la migration des cellules ainsi que la cicatrisation des plaies. L'AH s'infiltré facilement dans les tissus, grâce à cette viscoélasticité qui dépend fortement des conditions de température, de pH et de force ionique. En effet, lorsque le pH est acide ($\text{pH} < 4$) ou basique ($\text{pH} > 11$) (Miguel *et al.*, 2019), l'AH est hydrolysé, ce qui entraîne une diminution de sa viscosité et une perte de l'intégrité du réseau de polymères de l'AH. Cependant, l'AH peut subir des déformations tout en continuant de fixer des molécules d'eau et des ions nécessaires pour assurer l'hydratation des tissus. Toutes les caractéristiques mentionnées expliquent pourquoi il s'agit d'un bon matériau de remplissage. L'AH présente l'avantage d'être un composé non toxique, biocompatible et biodégradable (Dicker *et al.*, 2014). De plus, il peut être modifié chimiquement de manière covalente sur ses fonctions hydroxyles ou carboxylates afin notamment d'améliorer ses propriétés mécaniques par réticulation, et de réduire sa vitesse de dégradation. En effet, il est dégradé de manière enzymatique par les hyaluronidases et absorbable pour l'activation de multiples voies de signalisations.

L'AH peut être caractérisé en fonction de sa taille. Lorsqu'elle est comprise entre 6 000 et 1 000 kDa, l'AH est défini comme de haut poids moléculaire (HMW-HA, High Molecular Weight-Hyaluronic Acid). Pour les fragments compris entre 1 000 kDa et 250 kDa, les molécules d'AH sont appelées des MMW-HA (Medium Molecular Weight-Hyaluronic Acid). Les LMW-HA (Low Molecular Weight-Hyaluronic Acid) sont des fragments d'AH de taille comprise entre 250 et 10 kDa. Enfin, l'o-HA (Oligo-Hyaluronic Acid) est un AH de taille inférieure à 10 kDa. Une autre particularité de l'AH est sa présence sous une forme de très haut poids moléculaire (vHMW-HA) chez le rat taupe nu, associée à une résistance de ces animaux au cancer (Tian *et al.*, 2013). Cet éventail de poids moléculaires associés à des fonctions biologiques qui peuvent être différentes permet d'appréhender la balance existante entre les HMW-HA et les LMW-HA et la nécessité d'une régulation efficace lors des processus biologiques et pathologiques dont certains exemples sont cités dans le tableau 5 (Monslow *et al.*, 2015).

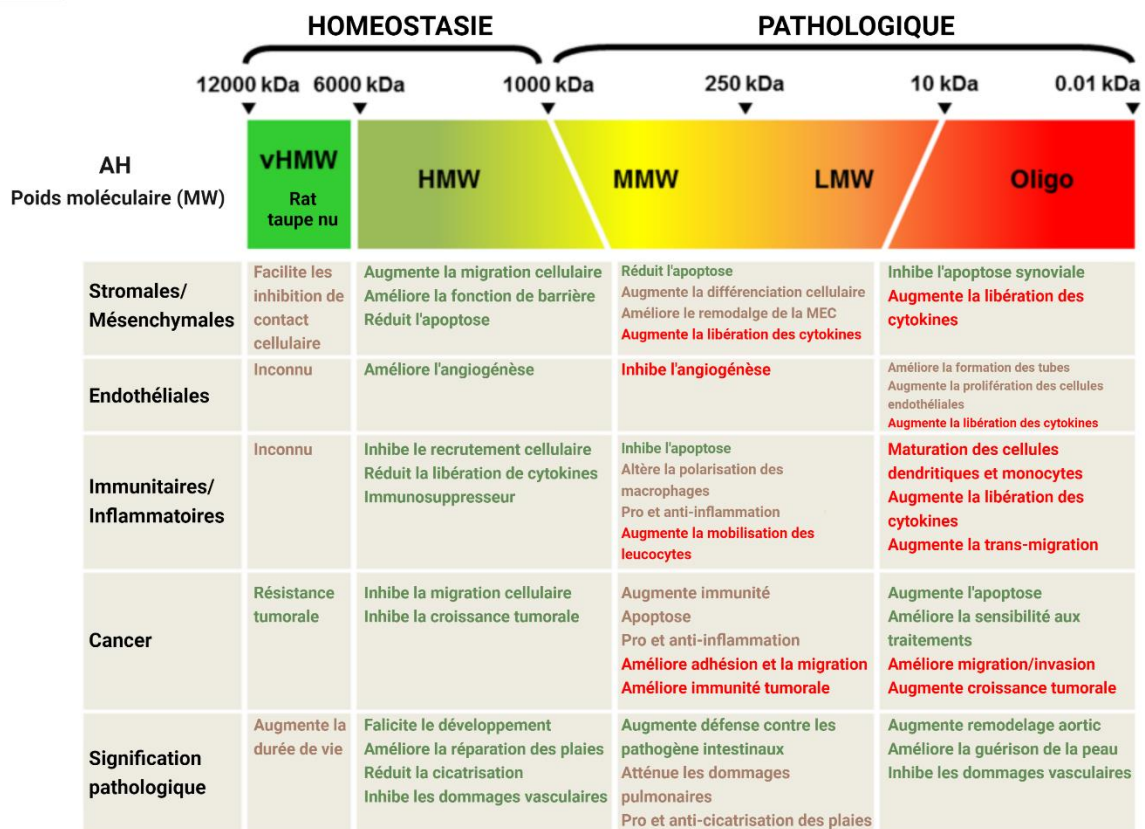


Tableau 5: résumé et signification pathologique de la taille de l'AH in vivo (d'après Monslow et al, 2015).

Le poids moléculaire (MW) de l'AH est divisé en très élevé (vHMW 6000-12000 kDa ; AH de rat taupe nu), élevé (HMW > 1 000 kDa), moyen (MMW 250-1 000 kDa), faible (10-250 kDa), et Oligo-HA.

L'omniprésence de l'AH dans de nombreux tissus lui confère la capacité de déclencher des interactions ligand-récepteur avec des hyaladhérines, parmi lesquelles se trouvent CD44, TLR-2/4, RHAMM, Stab-2/HARE, TSG-6, LYVE-1.

3. Les Hyaladhérines

3.1. CD44

Le CD44 ou Cluster of Differentiation 44 est une glycoprotéine de surface cellulaire longtemps étudiée en raison de son rôle essentiel dans les activités physiologiques des cellules normales et les activités pathologiques des cellules cancéreuses, telles que la prolifération, l'adhérence et la migration cellulaires, l'angiogénèse, l'inflammation et le réarrangement du cytosquelette (Weng et al., 2022). Il a été démontré que CD44, par son interaction avec l'AH, régule des mécanismes comme la migration cellulaire, la survie et l'adhérence cellulaire, et

laisse supposer son implication dans l'homéostasie tissulaire. C'est également un récepteur qui peut être soumis à l'épissage alternatif de son domaine extracellulaire par délétion/apparition d'un ou plusieurs exons au niveau de sa région variable (CD44v) (**Figure 22 ▼**). Au niveau pulmonaire, il a été démontré que les fragments d'AH, via leur interaction avec CD44, favorisent la dimérisation CD44-EGFR, l'activation EGFR/MAPK et en conséquence la surproduction de la mucine MUC-5B, mimant ainsi l'effet des ROS (Casalino-Matsuda *et al.*, 2009). Par ces interactions, l'activité des tyrosines kinases associées aux voies de signalisation médiées par MAPK ou NF- κ B est augmentée chez les patients atteints de bronchites chroniques et autres pathologies pulmonaires où le stress oxydatif et l'hypersécrétion de mucus sont présents (Casalino-Matsuda *et al.*, 2004).

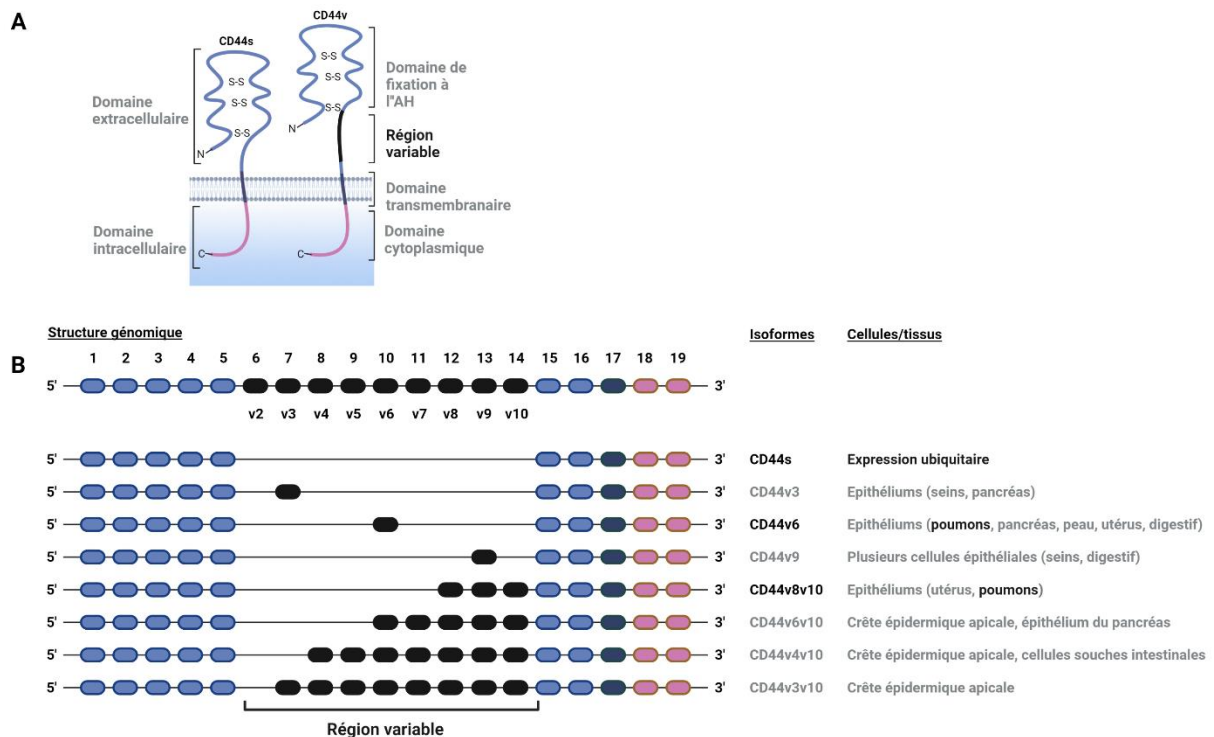


Figure 22: épissage alternatif du récepteur CD44 humain (modifiée d'après Weng *et al.*, 2022).

A-Structure de la protéine CD44 ; B-Variants CD44 ; toutes les isoformes de CD44 ont un domaine de liaison à l'AH. CD44s est la plus petite isoforme de CD44 et ne contient pas d'exons d'épissage.

3.2. RHAMM

RHAMM ou Receptor for Hyaluronan Mediated Motility, est une protéine associée aux microtubules jouant un rôle dans la motilité cellulaire. Le domaine unique de liaison de RHAMM à l'AH a été identifié, qui se compose de deux acides aminés basiques (K ou R) flanquant un enchaînement de sept acides aminés (Yang *et al.*, 1994). La liaison de l'AH à RHAMM favorise la phosphorylation des protéines kinases du complexe d'adhésion cellulaire incluant FAK1 (Hall *et al.*, 1994). Ce récepteur est également impliqué dans des processus de transformation, dans la croissance ou encore la prolifération cellulaire en régulant l'activité des kinases ERK. Ainsi, RHAMM peut interagir avec l'actine et les microtubules cellulaires (Assmann *et al.*, 1999), ce qui suggère l'implication de l'AH à moduler les fonctions associées comme la migration et la prolifération cellulaire (Turley *et al.*, 2002). Il a été démontré également que l'AH participerait à la protection des voies aériennes en augmentant la fréquence du battement ciliaire (CBF) des cellules de l'épithélium des voies aériennes. En effet, l'AH, augmente la CBF de 16 % après une semaine de traitement de cellules trachéales ovines (Lieb *et al.*, 2000). Cette augmentation de la CBF stimulerait la clairance mucociliaire via l'interaction AH-RHAMM au niveau de l'apex des cellules ciliées trachéales (Forteza *et al.*, 2001). Enfin, il a été démontré que les HMW-HA seraient fragmentés par les ROS en LMW-HA ce qui aurait pour conséquence d'augmenter la CBF via une voie de signalisation médiée par RHAMM (Manzanares *et al.*, 2007).

3.3. TLRs

Les TLRs (Toll-Like Receptors) jouent un rôle essentiel dans la défense de l'hôte. Ils sont présents à la surface des cellules (TLR-1-6,-10) et dans les endosomes (TLR-3, TLR-7/8, TLR-9). Les cellules pulmonaires expriment tous les récepteurs TLR en particulier TLR2, TLR-3, TLR-4, TLR-5 et TLR-6 (**Figure 23 ►**) (Kovach and Standiford, 2011). L'implication de l'AH de bas poids moléculaire dans l'inflammation serait associée à son interaction avec les récepteurs TLR-4 et dans une moindre mesure, TLR-2. TLR-4 est notamment impliqué dans l'immunité innée en réponse au LPS. Il active la voie NF- κ B participant ainsi à l'expression de cytokines via MyD88, TIRAP et TRAF6 nécessaires au déclenchement de la réponse inflammatoire (Arbour *et al.*, 2000).

L'interaction AH/TLR est importante les processus de réparations des dommages pulmonaires. L'AH et le LPS activent les TLRs et induisent l'expression de nombreux gènes. Pour exemple, des cellules cultivées en présence d'AH montrent une induction de gènes comme

le *tgf-β2* et la *mmp-13*. De façon surprenante, ces gènes n'ont pas été induits par le LPS bien que l'AH et LPS partagent le même récepteur TLR4. Cela suggère que les récepteurs TLRs peuvent engager différentes réponses en fonction qu'il s'agisse d'une inflammation infectieuse par le LPS ou d'une inflammation stérile par l'AH. Pour exemple, le complexe TLR-4/MD-2/CD44 reconnaît l'AH lors d'une inflammation non infectieuse (Taylor *et al.*, 2007) alors que le complexe TLR-4/MD-2/CD14 reconnaît le LPS lors d'une inflammation infectieuse (Płóciennikowska *et al.*, 2015).

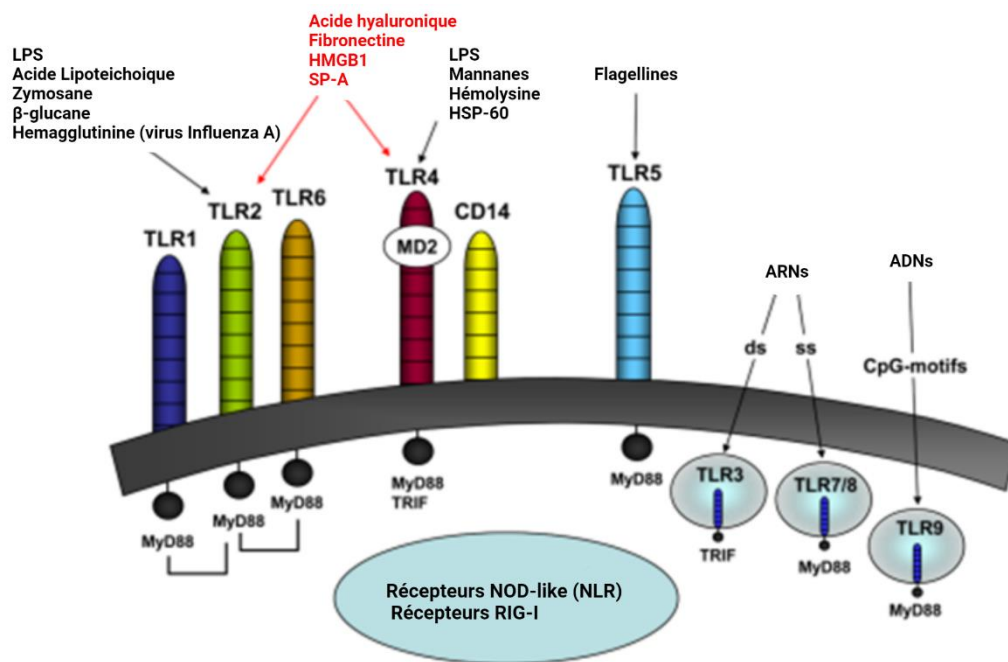


Figure 23: PAMPs et DAMPs associés aux récepteurs TLRs (d'après Kovach *et al.*, 2011).

3.4. Stabiline-2 / HARE

Stabiline-2 (Stab-2) est un récepteur pour différents glycosaminoglycanes sulfatés parmi lesquels se trouvent l'héparine, le chondroïtine sulfate et le dermatane sulfate, mais également non sulfaté comme l'AH. Stab-2 est impliqué dans les processus d'apoptose, d'endocytose de l'AH, et peut servir à maintenir l'intégrité des tissus en favorisant le renouvellement de la MEC. Il peut également contribuer au maintien de la fluidité des liquides corporels par résorption de l'AH et ainsi participer à son catabolisme. La protéolyse de Stab-2 (315 kDa) conduit à un récepteur de 190 kDa, HARE, pour Hyaluronic Acid Receptor for Endocytosis, impliqué dans l'internalisation de l'AH. En effet, la présence de motif d'endocytose nommés M1 (YSYFRI²⁴⁸⁵), M2 (FQHF²⁴⁹⁵) et M3 (NPLY²⁵¹⁹) situés dans le

domaine cytoplasmique de HARE, sont indispensables à l'internalisation de l'AH. Ce rôle fondamental dans l'endocytose de l'AH repose sur l'activation du motif M3 par la phosphorylation de la Tyr²⁵¹⁹ (Pandey *et al.*, 2016, 2015, 2008). L'endocytose de l'AH médiée par HARE va activer des voies de signalisation intracellulaires comme NF- κ B et ERK1/2 et l'expression des gènes associés. Cependant, cette activation reste dépendante de la taille de l'AH : seuls les AH avec une taille comprise entre 40 et 400 kDa, avec une taille optimale de 140 kDa, sont capables d'activer ces voies de signalisation, à l'inverse des bas (< 40 kDa) ou hauts poids moléculaires d'AH (> 1000 kDa) qui sont endocytés mais qui ne les activent pas (Pandey *et al.*, 2013). Ainsi HARE/Stab-2, en plus de participer au recyclage de l'AH, est impliqué dans la régulation positive de l'inflammation médiée par les LMW-HA.

3.5. TSG-6

La protéine TSG-6 (Tumor necrosis factor-Stimulated Gene-6) est capable elle aussi d'interagir avec l'AH. C'est une protéine sécrétée à un niveau élevé en condition inflammatoire. En plus d'avoir un effet protecteur contre la Kallikreine tissulaire, il semblerait que TSG-6 jouerait un rôle protecteur de la surface épithéliales bronchique en augmentant la production d'anti-protéases (Forteza *et al.*, 2007). TSG-6 est connu pour jouer un rôle dans la réticulation de l'AH ou lors d'épisodes inflammatoires car il augmenterait la résistance de l'AH face à la fragmentation par les ROS. Un AH constitué de 4 répétitions dissacharidiques est capable d'interagir avec les modules Link de TSG-6. Le changement conformationnel, à la suite de cette liaison, induit l'apparition de cinq résidus clés de liaison à l'AH, Lys¹¹, Tyr¹², Tyr⁵⁹, Phe⁷⁰ et Tyr⁷⁸ (Blundell *et al.*, 2005; Mahoney *et al.*, 2001). Ces interactions permettent d'augmenter la réticulation de l'AH, TSG-6 jouant le rôle d'intermédiaire moléculaire important dans le processus de formation des chaînes 2D et 3D d'AH (Day and de la Motte, 2005). Cette conformation de l'AH favorise son interaction avec le récepteur CD44 (Lesley *et al.*, 2004). Dans un modèle murin d'infection respiratoire à bactéries Gram-, il a été démontré que l'AH subit des modifications de chaînes lourdes, suivies de sa fragmentation, sa clairance et son recyclage. Ce turn-over de l'AH serait associé à une augmentation de la production de TSG-6 et de l'expression des AH synthases (Ni *et al.*, 2018). La protéine TSG-6 représente donc un élément important dans la réponse inflammatoire lors de lésion pulmonaire, en particulier induite par une infection bactérienne. Il a en outre été démontré que le TSG-6 se lie au CD44 sur les cellules inflammatoires soit directement, soit dans un complexe avec l'AH, ce qui

entraîne la dissociation du complexe CD44 / TLR (TLR-2, TLR-4), limitant ainsi la signalisation pro-inflammatoire NF- κ B médiée par les TLR (Mittal *et al.*, 2016).

3.6. LYVE-1

Le récepteur LYVE-1 (Lymphatic Vessel Endothelial Receptor-1) est une glycoprotéine transmembranaire, exprimée de manière sélective dans l'endothélium des capillaires lymphatiques. Ce récepteur joue un rôle dans l'adhérence des leucocytes médiée par l'AH et dans la clairance de l'AH (Johnson *et al.*, 2007; Prevo *et al.*, 2001). En effet, il favorise l'absorption de l'AH de poids moléculaire intermédiaire (MMW) et élevé (HMW). LYVE-1 participe également à la lymphangiogenèse induite par les fragments d'AH (Wu *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015).

Les interactions de l'AH, toutes tailles confondues, avec les récepteurs de surface cellulaire vont moduler de nombreuses fonctions cellulaires décrites dans le paragraphe suivant (Fallacara *et al.*, 2018; Vigetti *et al.*, 2014) (**Figure 24 ▼**).

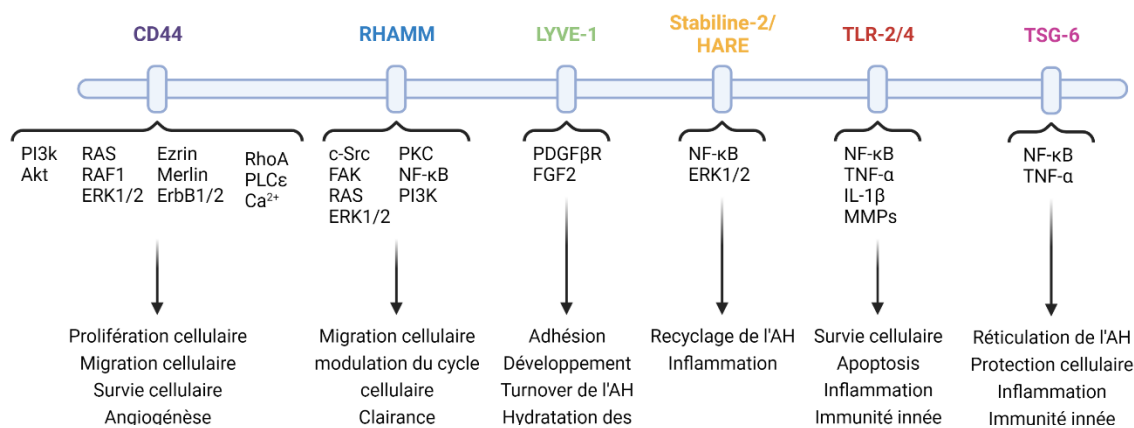


Figure 24: interactions de l'acide hyaluronique avec ses différentes hyaladhérines et cascades de signalisation à l'origine des fonctions cellulaires et tissulaires de l'AH (modifiée d'après Vigetti *et al.*, 2014 ; Fallacara *et al.*, 2018).

4. Les fonctions associées à l'Acide Hyaluronique

4.1. Acide hyaluronique et migration cellulaire

L'AH favorise la migration de différents types cellulaires (épithéliales, endothéliales et immunitaires) par ses liaisons avec le récepteur transmembranaire CD44. Cette migration

cellulaire médiée par le couple AH / CD44, au niveau des cellules endothéliales et des cellules immunitaires, est impliquée dans l'extravasation de ces dernières (Jiang *et al.*, 2011). Par ailleurs, dans des conditions physiologiques, l'AH est indispensable au développement (Tanaka *et al.*, 2001), cependant, dans un contexte pathologique l'AH est impliqué dans les processus de cancer en favorisant la migration cellulaire et la progression tumorale (Bourguignon *et al.*, 2000; Li and Heldin, 2001). Il a également été démontré que les HMW-HA favorisent la migration des cellules musculaires lisses vasculaires en modifiant la disposition des fibres de stress en actine et en favorisant la formation de lamellipodes (Gouëffic *et al.*, 2006).

4.2. Acide hyaluronique et prolifération cellulaire

Au niveau endothélial, il a été démontré que les HMW-AH se lient au CD44 des cellules endothéliales et bloquent leur prolifération (West and Kumar, 1989). A l'inverse, les LMW-AH stimulent la prolifération des cellules endothéliales et participent ainsi à la stimulation de l'angiogenèse via une voie de signalisation médiée par RHAMM (Gao *et al.*, 2008; Lataillade *et al.*, 2010). Au niveau des cellules musculaires lisses, la liaison des HMW-AH au CD44 inhibe la progression du cycle cellulaire, alors qu'à l'inverse, la liaison des LMW-AH au CD44 stimule cette prolifération. Il a été démontré que la cycline D1 est la cible principale des LMW-AH et des HMW-AH et que les effets opposés résultent d'une régulation différentielle des voies de signalisation vers la cycline D1 : la liaison des HMW-AH à CD44 inhibe sélectivement la signalisation Rac-dépendante, tandis que la liaison des LMW-AH à CD44 stimule sélectivement l'activation de ERK et l'expression du gène de la cycline D1 dépendante de ERK (Kothapalli *et al.*, 2008).

4.3. Acide hyaluronique et différenciation cellulaire

Il a été démontré que RHAMM joue un rôle dans la régulation de la ciliogénèse des cellules épithéliales respiratoires quand ces dernières sont cultivées sur les biomatériaux à base d'AH. En effet, des membranes constituées d'AH estérifiés (HYAFF®) favorisent la différenciation ciliaire des cellules épithéliales respiratoires en présence d'acide rétinoïque (Huang *et al.*, 2010). En outre, il a été démontré que ce type de biomatériaux remplace partiellement l'acide rétinoïque au cours de la différenciation ciliaire via son interaction avec RHAMM (Huang *et al.*, 2013). L'AH est également capable, par son interaction avec le récepteur CD44, de réguler la différenciation des kératinocytes conduisant à la formation de la

couche cornée (Bourguignon *et al.*, 2006) ainsi que la différenciation des cellules endothéliales (Takahashi *et al.*, 2005).

4.4. Acide hyaluronique et apoptose

Les HMW-AH jouent un rôle dans la régulation de l'apoptose. En effet, il a été démontré que l'augmentation de la production de HMW-AH *in vivo* via par la surexpression de HAS-2 sous contrôle du promoteur du gène CC10 diminue la mortalité des souris, les lésions pulmonaires et l'apoptose des cellules épithéliales après l'administration de fortes doses de bléomycine (Jiang *et al.*, 2006, 2005). A l'inverse, les HMW-AH inhibent la prolifération et induisent, à concentration élevée, la mort cellulaire des macrophages par leur interaction avec CD44 et/ou RHAMM (Sheehan *et al.*, 2004).

4.5. Acide hyaluronique et transport mucociliaire

Par son interaction avec RHAMM, l'AH stimule le battement ciliaire et donc la clairance mucociliaire des corps étrangers (Forteza *et al.*, 2001). Il a en outre été démontré au sein de notre laboratoire que les LMW-AH protègent l'épithélium des voies aériennes contre les lésions induites par les produits bactériens lors d'une infection. En effet, l'expression et la fonctionnalité des molécules d'adhérence intercellulaire sont augmentées par l'AH, qui peut également agir comme une molécule lubrifiante à la surface de l'épithélium des voies respiratoires (Zahm *et al.*, 2011).

4.6. Acide hyaluronique et processus inflammatoire (revue)

Comme nous l'avons évoqué dans ce chapitre, l'AH peut se présenter sous forme de HMW-AH ou de LMW-AH, qui présentent des fonctions différentes, via leur interaction avec des récepteurs distincts. Ces fonctions peuvent être totalement inversée en fonction du poids moléculaire de l'AH. Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne la modulation de l'immunité innée et de l'inflammation. Cette notion est présentée dans la revue présentée ci-après.



Review

Lung Hyaluronasome: Involvement of Low Molecular Weight Ha (Lmw-Ha) in Innate Immunity

Antony Hoarau, Myriam Polette and Christelle Coraux *

Inserm UMR-S 1250, University of Reims Champagne-Ardenne (URCA), SFR Cap-Santé, 51100 Reims, France; antony.hoarau@univ-reims.fr (A.H.); myriam.polette@univ-reims.fr (M.P.)

* Correspondence: christelle.coraux@univ-reims.fr

Abstract: Hyaluronic acid (HA) is a major component of the extracellular matrix. It is synthesized by hyaluronan synthases (HAS) into high-molecular-weight chains (HMW-HA) that exhibit anti-inflammatory and immunomodulatory functions. In damaged, infected, and/or inflamed tissues, HMW-HA are degraded by hyaluronidases (HYAL) or reactive oxygen species (ROS) to give rise to low-molecular-weight HAs (LMW-HAs) that are potent pro-inflammatory molecules. Therefore, the size of HA regulates the balance of anti- or pro-inflammatory functions. The activities of HA depend also on its interactions with hyaladherins. HA synthesis, degradation, and activities through HA/receptors interactions define the hyaluronasome. In this review, a short overview of the role of high and low-molecular-weight HA polymers in the lungs is provided. The involvement of LMW-HA in pulmonary innate immunity via the activation of neutrophils, macrophages, dendritic cells, and epithelial cells is described to highlight LMW-HA as a therapeutic target in inflammatory respiratory diseases. Finally, the possibilities to counter LMW-HA's deleterious effects in the lungs are discussed.

Keywords: hyaluronic acid; lung; inflammation; innate immunity



Citation: Hoarau, A.; Polette, M.; Coraux, C. Lung Hyaluronasome: Involvement of Low Molecular Weight Ha (Lmw-Ha) in Innate Immunity. *Biomolecules* **2022**, *12*, 658. <https://doi.org/10.3390/biom12050658>

Academic Editor: Jakub Suchánek

Received: 5 April 2022

Accepted: 28 April 2022

Published: 30 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Hyaluronic acid (HA) was discovered in the Department of Ophthalmology at Columbia University, New York, in 1934 in the bovine vitreous humor [1]. HA is an unsulfated glycosaminoglycan consisting of glucuronic acid and glucosamine disaccharide repeating units linked together by glycosidic bonds. It can reach a weight of about 10^7 Da and a size of about $25 \mu\text{m}$. HA also has important viscoelastic properties: each HA molecule has hydrophilic and hydrophobic endings, and, thanks to the complementary poles, the HA molecules assemble to form a polymer. This characteristic allows the formation of a gel with the viscoelastic properties necessary for effective medical options to treat joint pains [2]. The main specificity of HA is its high affinity for water. HA is able to absorb up to one thousand times its weight in water with an unbranched linear topology. In addition, HA is a critical component of the extracellular matrix (ECM) that regulates the development, normal structural integrity, as well as responses during injury, repair, and regeneration [3]. The activities of HA are mediated through interactions with cell surface receptors called hyaladherins, including Cluster of Differentiation-44 (CD44), Toll-like Receptor 2 and 4 (TLR2, TLR4), Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility (RHAMM), Hyaluronic Acid Receptor for Endocytosis (HARE), and Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6 (TSG-6). Under physiological conditions, HA is synthesized as High-Molecular-Weight-HAs (HMW-HAs) that assume anti-inflammatory functions, mainly through CD44 interactions [4]. Infectious and inflammatory environments lead to HMW-HA fragmentation into Low-Molecular-Weight-HAs (LMW-HAs) that activate pro-inflammatory signaling pathways. This effect is associated with interactions, primarily with TLR2 and TLR4, and HARE receptors. Their presence in plasma membranes could explain the pro-inflammatory function of LMW-HA. Finally, HA interacts with RHAMM, a microtubule-associated protein

involved in cell motility, transformation processes, and cell growth and proliferation [5]. The synthesis, degradation, and activities of HA through HA–receptor interactions define the hyaluronasome that represents a functional unit leading to cell response depending on its environment. The hyaluronasome remains dynamically sensitive to extracellular and intracellular stimuli. Therefore, a specific response related to the size of HA could provide information about the cell environment. These size-dependent roles prompted us to discuss the influence of HMW-HA/LMW-HA imbalance in the lung.

2. Physiological Context and HMW-HA

2.1. HMW-HA Synthesis

HA is present as HMW-HA at a steady state. It is synthesized by fibroblasts, epithelial and immune cells, as well as mesenchymal and hematopoietic stem cells [6]. Their production is regulated by the transmembrane enzymes hyaluronan synthases (HAS). In humans, three different genes located in the 19q13.4, 8q24.12, and 16q22.1 loci encode the HAS1, HAS2, and HAS3 isoforms, respectively. The enzymatic activity of HAS operates on the inner side of the plasma membrane and extrudes the forming polymer to the extracellular medium [7]. This mode of HA production allows the extension of the disaccharide repeats necessary to obtain HMW-HA. The turnover of HMW-HA is rapid, with a complete renewal in less than a day [8,9]. The molecular weight of HA produced in vitro by HAS3 in fibroblasts is 10^5 – 10^6 Da, while production by HAS1 and HAS2 is at least twice as high [10]. It has been reported that fibroblasts overproduce HA during their proliferation, in comparison to their resting phase. Moreover, cell proliferation is specifically dependent on neosynthesized HA [11]. HA production is regulated by different stimuli, including Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), and Interleukine-1 β (IL-1 β) [12,13]. In addition to HAS, enzymes such as uridine diphosphate–glucose dehydrogenase (UDGH) and uridine diphosphate–glucose pyrophosphorylase (UDGP) may also promote HMW-HA formation [14].

2.2. Beneficial Roles of HMW-HA

The HA properties have been described based on their molecular weight. In their native form (>1000 kDa), HMW-HA interactions with ECM components play an important role in the ECM's stability and structural organization. They promote cell quiescence and support tissue integrity. Indeed, through interaction with CD44, they lead to cell cycle arrest [15]. Via CD44, HMW-HA enhanced vascular integrity in vitro and in vivo in a murine model of LPS-induced acute lung injury [16]. It protects cells against apoptosis in the intestinal epithelium: irradiated mice are characterized by increased expression of HA synthases and HMW-HA in the intestine and the plasma. The injection of HMW-HA before radiation leads to the survival of the intestinal crypt and a decrease in radiation-induced apoptosis mediated by TLR4 [17]. Moreover, they can decrease both β -hexosaminidase secretion and histamine release, and block degranulation in the basophilic leukemia of rats [18]. Very HMW-HAs (vHMW-HAs) could also exhibit interesting properties in cancer research. They were associated with cancer resistance in a model of a naked mole-rat [19]. HMW-HAs participate in the oral wound healing process by forming a scaffold suitable for periodontal tissue regeneration [20,21]. They have also been extensively studied in aging-associated diseases, such as knee arthritis or rheumatoid arthritis. HMW-HAs participate in the maintenance of the viscosity of the articular liquid, as well as in the maintenance of the integrity of the cartilage via their interactions with aggrecan [22,23]. Through the CD44 receptor, HMW-HAs also induce osteoclast differentiation via the activation of the Rho kinase–NF- κ B pathway [20]. HMW-HAs have extensively been described as anti-inflammatory mediators by suppressing cell–cell interactions, or ligand access to cell surface receptors. As an example, HMW-HAs inhibit periodontal inflammation by preventing *P. gingivalis*-induced activation of I κ B α , extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), and mitogen-activated protein kinases (p38MAPK) [21]. Moreover, they improve synovial inflammatory pain by suppressing the CD44-mediated IL-6-induction of matrix

metalloproteinase (MMP) secretion in human chondrocytes [24]. HMW-HAs exert anti-inflammatory effects on renal, nervous, or ENT (Ear, Nose, and Throat) tissues [25–27] and, by downregulating TNF- α , IL-8, and inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) expression, on fibroblast-like synoviocytes [28]. At the respiratory level, HMW-HAs suppress the polarization of M1 macrophages, improve the production of IL-10 in lungs inflamed by PM 2.5 particles and promote decreases in p38 and JNK phosphorylation [29,30]. HMW-HAs lead to the inhibition of prostaglandin E2 (PGE2) macrophage-associated production by suppressing lipopolysaccharide (LPS)-induced Cyclooxygenase 2 (COX2) [31,32]. HMW-HAs ameliorate respiratory failure in acute COPD exacerbation by lowering systemic inflammation markers in a clinical trial [33]. This raises questions about their potential synergistic action associated with other anti-inflammatory drugs. Their biological effects could be at the origin of an interesting therapeutic strategy in the context of inflammatory lung diseases.

2.3. Therapeutic Use of HMW-HA

HMW-HAs represent good candidates for therapeutic strategies in tissue regeneration, dermatology, or orthopedics. Their rheological properties facilitate cell proliferation, migration, and wound healing [34]. HA serves as a temporary matrix that allows, mainly due to its large molecular size, the diffusion of nutrients and waste products into the site of injury. Several important functions associated with HA during the wound healing process originate from its interaction with the CD44 receptor [35]. HA directly affects the proliferation and migration of keratinocytes [36]. These findings led to the development of HA-based biomaterial (HYAFF[®]) as a scaffold for tissue repair. This biomaterial allows cellular invasion and capillary growth, processes that are fundamental for skin re-epithelialization. It has been indicated for the management of partial- and full-thickness wounds, second-degree burns, pressure ulcers, venous ulcers, chronic vascular ulcers, as well as surgical and trauma wounds [37]. HMW-HAs represent high interest in a gel-like form in chronic inflammatory diseases, such as joint pain or rheumatoid arthritis. This gel acts as a lubricant and shock absorber for the joint and tendon structures [38]. HMW-HAs readily infiltrate tissues due to their viscoelasticity, which is highly dependent on the weight and concentration of HA, temperature, pH, and ionic strength. They can also undergo deformation while retaining their water and ion-binding abilities. HMW-HAs are naturally non-toxic, biocompatible, and biodegradable compounds [39]. In addition, they can be chemically modified on their hydroxyl or carboxylate functions to improve their mechanical properties by cross-linking or to reduce their degradation rate [40]. Thus, HMW-HAs appear as a good filler material. However, the beneficial roles of HMW-HAs seem to be abbreviated in pathological contexts associated with infection and/or inflammation that lead to the enzymatic and/or chemical fragmentation of HMW-HA into LMW-HA.

3. Pathological Context and LMW-HA

3.1. HA Degradation

Hyaluronidases (HYALs) are secreted by epithelial or stromal cells in the inflamed lung. These enzymes are involved in HMW-HA degradation into short HA fragments of 10 to 250 kDa (LMW-HA) [41]. In humans, six members belong to the HYAL family of endoglucosaminidases: HYAL1 to HYAL4, PH-20, and HYALP1 [42]. They are classified according to their pH-dependent activity: the acidic hyaluronidases HYAL1, 2, and 3 are active at pH = 3 to 4 [43–46], whereas PH-20 is a neutral hyaluronidase that is active at pH = 5 to 8 [47]. Their localization also differs, with HYAL1 and HYAL3 being lysosomal hyaluronidases, while HYAL2 and PH-20 are membrane-bound. PH-20 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored enzyme. HYALP1 is a non-functional hyaluronidase encoded by a pseudogene, and HYAL4 has recently been re-identified as a chondroitin sulfate (CS)-specific hydrolase that does not act on HA [48]. HYAL expression and activity are tightly regulated by pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β [49]. Reciprocally, it has been shown that the use of HYAL inhibitors allows the downregulation of IL-18 production by allergen-stimulated keratinocytes [50], suggesting

a relationship between the expression of inflammatory cytokines, HYAL, and LMW-HA. A decrease in the microenvironment pH due to the Na⁺/H⁺ exchanger has also been described as contributing to the activation of HYAL2, which is necessary for the fragmentation of CD44-bound HMW-HA [51]. The CD44–HMW-HA–HYAL2 complex promotes the cleavage of HMW-HA into 20 kDa fragments corresponding to about 50 disaccharide repeats. These HYAL2-generated fragments are internalized and found in endosomes. The complete digestion of HA fragments by β -exoglycosidases, β -glucuronidase, β -N-acetylglucosaminidase, and HYAL1 within lysosomal vesicles allows them to reach a minimum HA size of 200 Da [52]. Recently, the HYBID protein (HYaluronan (HA)-Binding protein Involved in HA Depolymerization/KIAA1199/CEMIP) has been identified as capable of degrading HMW-HA. The HYBID protein is a hyaladherin present in human dermal and arthritic synovial fibroblasts [53,54]. HMW-HAs are endocytosed, degraded in endosomes, and excreted into the extracellular space in the presence of HYBID and clathrin. This degradation is independent of HYAL2 and CD44 in skin fibroblasts [55]. HMW-HAs can also be degraded in a non-specific manner by reactive oxygen species (ROS) [56,57]. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopic studies support the hypothesis that ROS-mediated cleavage of HMW-HA may be due to the β -cleavage of radicals formed at the first carbon of one of the monosaccharides, the C3 of N-acetylglucosamine, or the C4 of glucuronic acid [56]. The degradation products are then recycled to reform a HA chain, which will give rise to LMW-HA secretion in a pathological context. Interestingly, it has been demonstrated that emphysematous lungs are characterized by a significant decrease in the percentage of HA. This result suggests that most of the inhaled deleterious factors promote HA degradation or downregulate HA turnover, resulting in the development of lung emphysema in aged lungs [58]. LMW-HAs are also detected in bronchoalveolar lavage (BAL) fluids from patients with persistent asthma associated with chronic inflammation, suggesting ECM-associated HA degradation [59].

3.2. Overall Impact of LMW-HA

HA polymers of 10 to 250 kDa are considered LMW-HA. Their effects differ from those of HMW-HA. They have been reported in many cell models, such as epithelial cells, smooth muscle cells, endothelial cells, or fibroblasts, when under inflammatory conditions, or cells associated with innate immunity. LMW-HAs can trigger an inflammatory response by acting as an endogenous danger signal [60]. The pro-inflammatory signaling associated with LMW-HAs is known to occur mainly through their interactions with Toll-Like Receptors (TLR2 and TLR4). TLR receptors can initiate different responses depending on the stimulus. For example, the TLR4/MD-2/CD44 complex recognizes LMW-HA in non-infectious inflammation [61], unlike the TLR4/MD-2/CD14 complex, which interacts with LPSs in infectious inflammation [62]. Moreover, LMW-HAs increase the expression of TLR4, MyD88, TRAF-6, iNOS, MMP-13, IL-1 β , and IL-8, thus modulating both innate and acquired immunity [63]. LMW-HAs stimulate NF- κ B and promote the expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6, and IL-33 in synovial fibroblasts [64]. However, LMW-HA-associated effects appear to be tissue- or disease-dependent: the degradation of extracellular HMW-HA into LMW-HA following skin injury stimulates keratinocytes to release β -defensin-2 via TLR2 and TLR4 signaling involving a protein kinase C-dependent pathway mediated by c-Fos [65]. LMW-HA-induced activation of keratinocytes does not lead to an inflammatory response, as no IL-8, TNF- α , IL-1 β , or IL-6 production was detected [65]. These examples illustrate the bioactive roles of LMW-HA, mainly in triggering a tissue-dependent response associated with a physiological or pathological context.

4. HMW-HA/LMW-HA Balance in the Lung

Native HMW-HAs are hydrolyzed by HYAL1 and HYAL3 under physiological conditions [66] (Figure 1). HMW-HA intracellular degradation continues within lysosomal vesicles to reach a size of 200 Da. HAS-1 uses these degradation products to perform the neo-synthesis of HMW-HAs, which are then secreted into the ECM. HMW-HAs play

a protective role in epithelial cells and induce anti-inflammatory signaling by binding to CD44 [29]. HMW-HAs suppress macrophage M1 polarization, increase IL-10 production, and inhibit ROS-ASK1-p38/JNK-mediated epithelial apoptosis in fine particulate matter-induced lung inflammation and injury [29,30]. In contrast, ROS and HYAL, mainly HYAL2, fragment HMW-HAs into LMW-HAs, which are degraded into 200 Da fragments in lysosomes under pathological and inflammation-associated conditions. HAS3 then leads to the recycling and generation of HA fragments of 10 to 250 kDa, which mainly regulate pro-inflammatory activities. The microenvironment can alter the HMW-HA/LMW-HA balance. An increased expression of TNF- α and IL-1 β , as well as the presence of ROS or an acidic pH, stimulate the production of LMW-HA [67]. The down-regulation of HAS1 expression or the upregulation of the expression of HYAL2 and HAS3 lead to the overproduction of LMW-HA. As an example, their production by fibroblasts is increased in the ventilated lung due to cell stretching, which promotes HAS3 expression and stimulates the tyrosine kinase signaling pathways, ultimately leading to increased expression of IL-8 [68]. This suggests that LMW-HA release could participate in the maintenance of the innate inflammatory response. The treatment of rats with bleomycin to induce alveolitis revealed a transient accumulation of LMW-HA in BAL, associated with an influx of T-cells, macrophages, and activated granulocytes into the lower airways [69–71]. Moreover, it was reported that HA, neutrophils, and IL-8 were more important in the bronchial sputum of COPD patients than in the sputum of non-COPD patients [72,73]. Finally, LMW-HAs have been shown to induce chemokine gene expression in alveolar macrophages in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [74], whereas asthmatic macrophages showed a decrease in cell surface CD44 expression and an increase in TLR2, TLR4, and IL-8 expression [60]. Thus, LMW-HAs could be defined as potential therapeutic targets in the resolution of inflammatory processes.

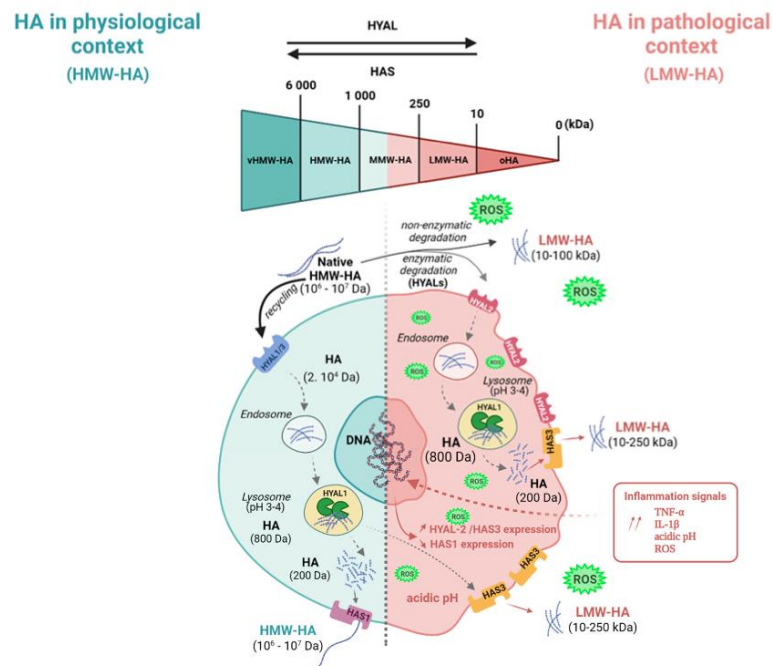


Figure 1. Catabolism and recycling of HA. In a physiological context, native HA (>1000 kDa) is mainly recycled by HYAL1 and HYAL3. Its intracellular degradation continues within lysosomal

vesicles to reach a 200 Da size. HAS1 mainly performs the neo-synthesis of HMW-HA. In a pathological/inflammatory context, HMW-HAs are fragmented by ROS and HYAL (mainly HYAL2) to form LMW-HAs with a size between 10 and 250 kDa, then degraded into 200 Da-sized fragments in lysosomes. The neo-synthesis of LMW-HA (10–250 kDa) occurs through HAS3. Created with BioRender.com.

5. LMW-HA and Lung Innate Immunity

The inflammation of the lung is a hallmark of respiratory diseases. Nonetheless, the molecular mechanisms associated with lung inflammation remain partially elucidated, in chronic obstructive lung disease (COPD), asthma, or infectious and/or genetic pathologies, such as bronchiectasis and cystic fibrosis (CF). In the human lung, the respiratory epithelium provides a physical barrier between the external environment and the underlying parenchyma. Its histology varies from the trachea to the alveoli, from a cylindrical pseudostratified epithelium composed of ciliated, basal, and secretory cells, to a monostratified epithelium containing type-1 and type-2 pneumocytes [75]. Lung inflammation is triggered by pathogens or by the inhalation of toxic particles or allergens. These stimuli favor the establishment of innate immunity, the first immune barrier.

The alarmins released by the damaged epithelium will alert immune cells via the increase in the epithelial expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-8). These effectors will promote the recruitment of immune cells (neutrophils, dendritic cells (DC), and macrophages) to the inflammatory site. The involvement of LMW-HA in this phenomenon has been reported in numerous studies (Table 1). However, LMW-HA accumulation in the lung would maintain and/or amplify the inflammatory response, leading to the development of a deleterious inflammation. The responses associated with LMW-HA depend on the type of HA receptor that is stimulated. All LMW-HA-hyaladherin (TLR, CD44, HARE/Stab2, TSG-6, or RHAMM) interactions belong to the lung hyaluronosome.

Table 1. LMW-HAs influence inflammatory marker expression.

Target Cell	LMW-HA (kDa)	Receptor	Pathways	Inflammatory Effector	References
Neutrophils	100–200	Not determined	Not determined	NE	[76,77]
	200	Not determined	PI3K/Akt1	IL-6	[78]
	200	Not determined	PI3K/Akt1	KC	[78]
	200	Not determined	PI3K/Akt1	MMP-9	[78]
	200	Not determined	PI3K/Akt1	MPO	[78]
	200	Not determined	PI3K/Akt1	Mcl-1	[78]
Macrophages	200	TLR2	NF- κ B	MIP-1 α/β	[60,79]
	80	TLR2 and TLR4	Not determined	IL-8	[74,80]
	100–150	TLR2 and TLR4	NF- κ B	CXCL2	[80]
	5	TLR2 and TLR4	Not determined	TNF- α	[81,82]
	5–200	Not determined	NF- κ B	NO	[81]
	Not determined	TLR2 and TLR4	Not determined	IL-1 β	[81]
	60–200	Not determined	NF- κ B	MMP-9	[82]
	Not determined	Not determined	Not determined	PAI-1	[83]
	Not determined	Not determined	Not determined	uPA	[83]
	80	TLR4	NF- κ B	IFN- β	[84]
	100–150	CD44-TLR4	Not determined	IL-6	[85]
	100–150	CD44-TLR4	ERK1/2 and p38MAPK	MCP-1	[85]
	200	TLR4	IRF3	IFN- β	[86]
	200	cPLA2 α Phosphorylation	ERK1/2, p38MAPK and JNK	COX2	[87]
	200	cPLA2 α Phosphorylation	ERK1/2, p38MAPK and JNK	PGE2	[87]
200	Not determined	NF- κ B	iNOS	[88]	
200	Not determined	Not determined	MMP-12	[89]	
280	CD44	Not determined	IL-12	[90]	
Dendritic Cells	80–200	TLR4	Not determined	IL-12	[91,92]
	80–200	TLR4	Not determined	TNF- α	[91,92]
	80–200	TLR4	Not determined	IL-1 β	[91,92]

Table 1. Cont.

Target Cell	LMW-HA (kDa)	Receptor	Pathways	Inflammatory Effector	References
Lung Epithelial Cells	Not determined	TLR4	Not determined	IL-6	[61]
	Not determined	CD44/TLR4/MD2/ MyD88	NF-κB	MIP-2	[61]
	Not determined	CD44/TLR4/MD2/ Ras	NF-κB	MMP-13	[61]
	Not determined	CD44/TLR4/MD2/ Ras	NF-κB	TGF-β2	[61]
	200	Not determined	ERK1/2, AP-1, NF-κB and JNK	IL-8	[93,94]
	200	Not determined	NF-κB	IP-10	[93]

5.1. Neutrophils

Neutrophils are leukocytes that play a central role in the immune response due to constant interactions with DC, macrophages, and lymphocytes. They synthesize and release numerous mediators, including pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-12, Interferon- α (IFN- α), IFN- δ , and IL-6) and anti-inflammatory cytokines (IL-1 Receptor Antagonist, TGF- β). Neutrophils also produce growth factors (granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)), C-X-C chemokines (IL-8 and Interferon- γ inducible protein-10 (IP-10)), C-C chemokines (macrophage inflammatory protein 1 (MIP-1 α and MIP-1 β)), and fibrogenic and angiogenic factors (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)) [95]. Neutrophils play also important roles in the innate immune response, in tissue repair, and the coordinated implementation of an optimal adaptive immune response [96]. They can detect chemical gradients of chemokines, such as IL-8, IFN- δ , and anaphylatoxin C5a, to direct their migration. IL-8 is the main chemoattractant involved in neutrophil migration and infiltration in the lung. IL-8 is secreted by fibroblasts, lung epithelial cells, and immune cells, including neutrophils, on which it has an autocrine action [95,97,98]. LMW-HAs increase the expression of IL-8 in vitro [68]. There were significant increases in IL-8, myeloperoxidase (MPO), and HA in the BAL fluid of chronic bronchitis patients [99]. Consequently, we can hypothesize that HA fragments enhance neutrophil chemotaxis through IL-8 production. The activity of neutrophils can be mediated by the HA-CD44 interaction. The contacts between the neutrophil membrane protein CD44 and the HA of the ECM limit neutrophil migration and infiltration [100]. CD44 expression may also be regulated under pathological conditions. The neutrophil expression of CD44 is significantly higher in the submucosa of COPD patients than in non-COPD smokers [101]. Since LMW-HAs play a pro-inflammatory role, one could assume their potential involvement in the regulation of CD44 expression by neutrophils, which, however, remains to be demonstrated. Nevertheless, the impact of LMW-HA on some functions of the neutrophils has been reported. LMW-HA treatment of mice inhibits the apoptosis of neutrophils via the PI3K/Akt1 pathway by upregulating Mcl-1 expression, which leads to triggering lung inflammation [78]. The microbicidal activity of neutrophils is achieved by the release of neutrophil elastase (NE), a serine protease with broad specificity, including elastin, fibronectin, laminins, collagens, and proteoglycans [102,103]. NE can accelerate the development of progressive obstructive airway disease in bronchiolitis obliterans due to its elastolytic activity [104], as well as the development of emphysema, as demonstrated in α 1-antitrypsin-deficient mice [105,106]. Surprisingly, LMW-HAs may provide a protective role against the NE-mediated degradation of lung elastin in vivo independently of enzymatic inhibition [107,108]. The intratracheal administration of LMW-HA allows a significant reduction of NE-induced airway enlargement [76,109].

5.2. Macrophages

Monocytes and macrophages are immune cells that belong to the mononuclear phagocyte system. Circulating monocytes can migrate to inflamed tissues and differentiate into immature DC or macrophages under the influence of growth factors or cytokines. Monocytes serve as a lifelong reservoir, while macrophages derived from monocytes represent

the immediate effectors of innate immunity. Alveolar and tissue macrophages provide an immediate defense against foreign agents and participate in the inflammation and the repair process of injured tissues by the selective release of cytokines that contribute to tissue remodeling. They also participate in the initiation and development of the adaptive immune response. The phenotypic changes of macrophages may depend on the molecular weight of HA, with a pro-inflammatory response for LMW-HA or a pro-resolving response for HMW-HA [81]. LMW-HAs promote macrophage activation by stimulating the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines [74,80,82,85,90,110]. The NF- κ B/I κ B pathway plays a major role in this phenomenon and the propagation of the tissue inflammatory response [84]. HA fragments also induce IFN- β through a MyD88-independent pathway involving TLR4. It has been proposed that IFN- β expression is generated by LMW-HA/TLR4 stimulation through the intervention of TRIF, TBK1, and IRF-3 molecular intermediates, even in the absence of viral infection [86,110]. In addition to TLR4, TLR2/MyD88 signaling allows LMW-HA to activate the innate immune response by stimulating the expression of macrophage-associated cytokines MIP-1 α in a NF- κ B-dependent pathway via TRAF6, IRAK, and PKC ζ [60]. This MIP-1 α production, as well as that of MIP-1 β and KC (IL-8), is, however, downregulated at both the mRNA and protein levels by IL-10 and IFN- δ in primary murine macrophages [79]. LMW-HA activation of macrophage CD44 can lead to an increased expression of inflammatory cytokines, such as TNF- α or IL-1 β , as well as the production of growth factors, including macrophage-derived insulin growth factor (IGF-1) [74,111]. LMW-HAs are also involved in lipid metabolism, as they induce the phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 α (cPLA2 α), ERK1/2, p38, and JNK via the TLR4/MyD88 pathways. This activation triggers an increase in the expression of COX2 and the production of PGE2, both playing an important role in immune and inflammatory phenomena [87]. Conversely, the HMW-HA treatment of LPS-stimulated macrophages decreases PGE2 and COX2 expression [87]. LMW-HAs regulate the expression of macrophage proteases by inducing plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and inhibiting urokinase activity in an inflammatory environment. This could explain the impaired fibrinolytic activity and the development of fibrosis in acute lung injury [83]. MMP-12 is a macrophage metalloelastase involved in tissue remodeling in COPD [112]. Its expression, secretion, and enzymatic activity are stimulated by LMW-HA in alveolar macrophages from bleomycin-treated rats [89]. Finally, LMW-HAs upregulate nitric-oxide synthase (iNOS) expression and iNOS activity through a pathway dependent on NF- κ B, promoting the release of nitric oxide in murine alveolar macrophages of inflamed lungs [88]. However, no study has demonstrated that LMW-HAs either alter the bactericidal properties of macrophages or increase cellular cooperation between macrophages and lymphocytes. Altogether, LMW-HAs participate in the activation of lung macrophages and maintain their pro-inflammatory activities.

5.3. Dendritic Cells (DCs)

DCs are leukocytes specialized in the antigenic presentation to T lymphocytes. They are rare cells derived from the differentiation of monocytes. They are found in all tissues, but in greater quantities in the T-zones of lymphoid organs. DCs exist in an immature form and play the role of sentinels specialized in antigenic capture and the detection of danger signals (infection, inflammation, and necrosis). These signals induce DC maturation, as well as a considerable increase in the expression of major histocompatibility complex (MHC) class-II and costimulatory molecules. Mature DCs migrate to the T-zones of lymphoid organs and stimulate naive T-cells. Therefore, they play a central role in the control of the immune response. Studies on the impact of HA on DCs are sparse. However, it has been demonstrated that DC activation is increased by LMW-HA produced at sites of inflammation. HA fragments induce the immunophenotypic maturation of DC and increase their production of IL-1 β , TNF- α , and IL-12 cytokines [91]. These effects are specific to HA fragments [91] and appear to depend on the TLR4 pathway [92]. Altogether, HA fragments may trigger the innate immune response at the DC level.

5.4. Lung Epithelial Cells

The respiratory epithelium actively participates in the innate immunity of the lung. Infection or epithelial damage leads to the loss of tissue homeostasis and causes the release of alarmins by the lung epithelial cells, thereby initiating an inflammatory response. One of the first epithelial responses is excessive mucus secretion to clear infection or foreign particles, including cigarette smoke components or fine particulate matter. LMW-HAs initiate pro-inflammatory signaling at the level of the respiratory epithelium through their interactions with hyaladherins. LMW-HAs can interact with the Stabiline-2 (Stab2)/HARE (Hyaluronic Acid Receptor for Endocytosis, half-length Stab2) receptor. Stab2 proteolysis leads to a 190 kDa receptor, HARE, which is involved in HA internalization thanks to the presence of endocytosis motifs [113–115]. Then, HARE-mediated HA endocytosis activates the NF- κ B and ERK1/2 intracellular signaling pathways. LMW-HAs also have pro-inflammatory effects through the activation of TLR signaling [116]. TLR2 and TLR4 are notably involved in innate immunity in response to LPS in the respiratory epithelium. LMW-HAs activate these receptors, leading to the stimulation of signaling pathways associated with inflammation, i.e., NF- κ B, MAPK, and JNK [93,117]. As a consequence, LMW-HAs enhance the expression and secretion of cytokines involved in the pulmonary inflammatory response, such as IL-8, IL-6, TGF- β 2, and MMP-13 [61,94]. Interactions with other hyaladherins, such as CD44 and RHAMM, may explain LMW-HA effects on lung epithelial cells in many inflammatory diseases. The gel-forming glycoproteins MUC-5AC and MUC-5B mucins, conferring lubricating properties to mucus, are overexpressed by airway secretory cells in CF and COPD [118–120]. In this context, an upregulation of mucins expression by LMW-HA through the CD44 receptor has been reported. The LMW-HA–CD44 interaction promotes CD44–EGFR dimerization, MAPK activation, and MUC-5B upregulation [121]. LMW-HAs may also exert beneficial effects on mucociliary clearance. The fragments of HA improve the ciliary beat frequency (CBF) of tracheal epithelial cells [122] through their interactions with RHAMM, a microtubule-associated protein involved in cell motility, transformation, growth, and proliferation [122–126]. Moreover, the treatment of airway epithelial cells with LMW-HA increases the expression of the tight-junction protein *Zonula occludens-1* (ZO-1), improves the transepithelial electric resistance of the epithelium [123], and can, therefore, participate in the maintenance of the epithelial barrier integrity.

6. LMW-HA Signaling Inhibition

The pro-inflammatory properties of LMW-HA could make it a potential therapeutic target for rapid return to a steady state. It is crucial to identify the molecular intermediates that inhibit LMW-HA signaling to counter their actions. For example, IL-1 Receptor-Associated Kinase-M (IRAK-M), mainly expressed by macrophages, DCs, and airway epithelial cells, could be an interesting target. This intracellular negative regulator of TLR signaling is involved in innate immune homeostasis [127]. Whether the IRAK-M regulation and downstream signaling pathways are different depending on TLR ligands (LMW-HA or LPS) remains to be elucidated. TSG-6 could also be a good candidate. This protein plays a key role in modulating the inflammatory response of bronchial epithelial cells and inflammatory cells. In particular, the binding of TSG-6 to CD44 through HA on inflammatory cells leads to the dissociation of CD44 from TLR2 and TLR4, ultimately leading to the inhibition of the TLR-dependent NF- κ B signaling pathway [128–130]. It is of the utmost importance to use relevant *in vitro* experimental models demonstrating the deleterious effects of LMW-HA to assess the therapeutic potential of such candidates before testing the hypotheses in animal models receiving an airway instillation of HA fragments. The use of primary cells and their cultures in three-dimensional (3D) differentiated structures is crucial. The cultivation of human primary airway epithelial cells at the air–liquid interface (ALI) [131] or as spheroids [132] is the best option. These 3D culture methods allow epithelial cells to form junctional and polarized epithelia composed of specialized cells, such as basal, secretory, or ciliated cells. The resulting epithelia are the closest *in vitro* rep-

resentation of in vivo functional airway epithelia exhibiting apical/basal-directed secretion (cytokines/chemokines, mucins, ions, growth factors, . . .) and coordinated beating cilia. The collection of cell secretions, total or fractionated cell proteins, or RNAs is easily achievable, giving the possibility of omics analysis. These 3D cultures also have the advantage of allowing the polarized co-culture of epithelial cells with other cell types, such as immune cells. The use of recombinant proteins/activators/inhibitors, and cutting-edge methods, such as CRISPR genome editing that allows the modulation of gene expression, will permit, in the future, testing the therapeutic benefits of IRAK-M or TSG-6 modulation to counter the pro-inflammatory action of a LMW-HA treatment in these in vitro models.

The inhibition of HAS3, involved in the production of LMW-HA, could also be an adequate strategy to minimize the pro-inflammatory properties of HA fragments. Phosphodiesterase 3 inhibitor Milrinone decreases HAS3 expression and inhibits LPS-induced lung inflammation and lung injury in ventilated rats [133]. Furthermore, corticosteroids, such as betamethasone or budesonide, reduce the concentration of LMW-HA in BAL fluids by decreasing the expression of HAS, as well as the phosphorylation of ERK and Akt signaling in vivo [134].

Since hypoxia frequently goes together with lung inflammation, it may appear as an attractive target. HMW-HA is degraded by hyaluronidases, such as HYAL1, resulting in LMW-HA fragments detected in the blood of patients with obstructive sleep apnea [135]. In this context, the use of extracellular superoxide dismutase (SOD) as a treatment could be considered. The intratracheal injection of SOD in a mouse model of asbestos-induced pulmonary injury inhibits LMW-HA-mediated lung inflammation [136]. To validate the potential use of SOD as a treatment against LMW-HA-mediated inflammation, a model of 3D airway epithelial cultures exposed to a hypoxic environment (1.5% O₂–5% CO₂–94.5% N₂) [137] or murine models exposed to 10% O₂ [138] could be used, with or without concomitant treatment with LMW-HA.

In addition to the deleterious pro-inflammatory functions of LMW-HA that could be interesting to counter, the beneficial activities of HA fragments may be enhanced. Interestingly, LMW-HAs play an anti-NE role [77]. This property could be leveraged in the treatment of diseases, such as COPD, to prevent elastin fragmentation and the development of emphysema [139,140].

7. Conclusions

HA is a major component of the ECM. It is synthesized into HMW-HAs, which exhibits anti-inflammatory functions. Under pathological conditions, HMW-HAs are degraded to give rise to LMW-HAs, which show pro-inflammatory properties. LMW-HAs are involved in innate immunity by activating associated cells, including neutrophils, macrophages, DC, and respiratory epithelial cells, thereby participating in lung protection. However, infection or inflammation may amplify the action of LMW-HAs via interactions with hyaladherins, leading to an increase in the secretion of cytokines (TNF- α , IFN- β , IL-6), chemokines (IL-8), ROS, or enzymes (NE, MMP-9, MMP-10, MMP-12). Although LMW-HAs may promote lung hyper-inflammation, they also have beneficial impacts on the airway epithelium. By increasing the CBF, they improve the mucociliary clearance, and, by modulating intercellular junction protein expression, they strengthen the integrity of the epithelial barrier. LMW-HAs exhibit a dual function in the lung, through the maintenance/amplification of inflammation and the protection of the lung epithelium (Figure 2). Regardless, the presence of LMW-HAs in the lungs/bronchial secretions correlates with the onset of pulmonary diseases. The most recent example is the detection of LMW-HA in respiratory secretions collected from intubated patients with COVID-19 and cadaveric lung tissues from COVID-19 patients [141]. Therefore, LMW-HA must be considered as a marker of lung inflammation in respiratory diseases that could be targeted in future therapeutics.

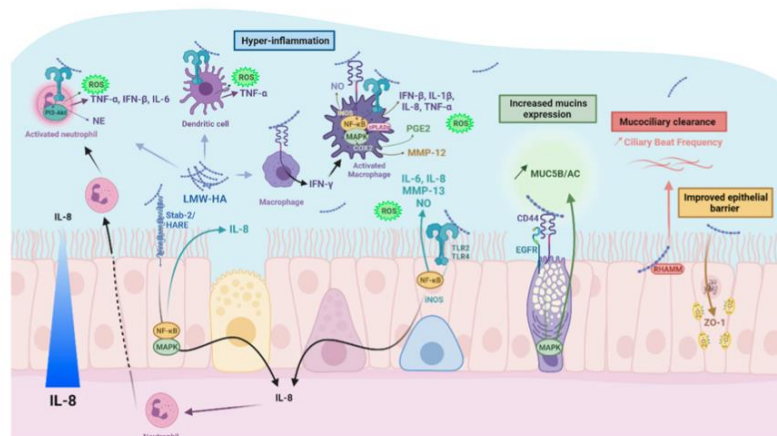


Figure 2. LMW-HA and lung hyaluronasome. LMW-HAs promote lung hyper-inflammation through hyaladherin interactions (CD44, TLR2, and TLR4, RHAMM, and HARE/Stab-2) and increase the secretion of cytokines (TNF- α , IFN- β , and IL-6), chemokines (IL-8), ROS, or enzymes (NE and MMPs). LMW-HAs also have beneficial impacts on the airway epithelium by increasing the CBF and by modulating intercellular junction protein expression. The dual functions of LMW-HAs maintain/amplify the lung inflammation while participating in the protection of the epithelium. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).

Author Contributions: Writing—original draft preparation, A.H.; writing—review and editing, M.P. and C.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Région Grand Est and University of Reims Champagne-Ardenne.

Acknowledgments: We are grateful to Valérien Dormoy for proofreading of our manuscript. We acknowledge Audrey Brisebarre and Emma Loeffler for their external reading of this review.

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

References

- Toole, B.P. Hyaluronan in Morphogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2001**, *12*, 79–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Richardson, C.; Plaas, A.; Block, J.A. Intra-Articular Hyaluronan Therapy for Symptomatic Knee Osteoarthritis. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* **2019**, *45*, 439–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Garantziotis, S.; Savani, R.C. Hyaluronan Biology: A Complex Balancing Act of Structure, Function, Location and Context. *Matrix Biol.* **2019**, *78–79*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Teder, P.; Vandivier, R.W.; Jiang, D.; Liang, J.; Cohn, L.; Puré, E.; Henson, P.M.; Noble, P.W. Resolution of Lung Inflammation by CD44. *Science* **2002**, *296*, 155–158. [[CrossRef](#)]
- Stern, R. Devising a Pathway for Hyaluronan Catabolism: Are We There Yet? *Glycobiology* **2003**, *13*, 105R–115R. [[CrossRef](#)]
- Weigel, P.H.; Hascall, V.C.; Tammi, M. Hyaluronan Synthases. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 13997–14000. [[CrossRef](#)]
- Prehm, P. Hyaluronate Is Synthesized at Plasma Membranes. *Biochem. J.* **1984**, *220*, 597–600. [[CrossRef](#)]
- Menzel, E.J.; Farr, C. Hyaluronidase and Its Substrate Hyaluronan: Biochemistry, Biological Activities and Therapeutic Uses. *Cancer Lett.* **1998**, *131*, 3–11. [[CrossRef](#)]
- Giannotti, M.I.; Rinaudo, M.; Vancso, G.J. Force Spectroscopy of Hyaluronan by Atomic Force Microscopy: From Hydrogen-Bonded Networks toward Single-Chain Behavior. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2648–2652. [[CrossRef](#)]
- Itano, N.; Sawai, T.; Yoshida, M.; Lenas, P.; Yamada, Y.; Imagawa, M.; Shinomura, T.; Hamaguchi, M.; Yoshida, Y.; Ohnuki, Y.; et al. Three Isoforms of Mammalian Hyaluronan Synthases Have Distinct Enzymatic Properties. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 25085–25092. [[CrossRef](#)]
- Yoneda, M.; Yamagata, M.; Suzuki, S.; Kimata, K. Hyaluronic Acid Modulates Proliferation of Mouse Dermal Fibroblasts in Culture. *J. Cell Sci.* **1988**, *90*, 265–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jacobson, A.; Brinck, J.; Briskin, M.J.; Spicer, A.P.; Heldin, P. Expression of Human Hyaluronan Synthases in Response to External Stimuli. *Biochem. J.* **2000**, *348*, 29–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Skandalis, S.S.; Karalis, T.; Heldin, P. Intracellular Hyaluronan: Importance for Cellular Functions. *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *62*, 20–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Chen, W.Y.; Marcellin, E.; Hung, J.; Nielsen, L.K. Hyaluronan Molecular Weight Is Controlled by UDP-N-Acetylglucosamine Concentration in Streptococcus Zooepidemicus. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18007–18014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Morrison, H.; Sherman, L.S.; Legg, J.; Banine, F.; Isacke, C.; Haipek, C.A.; Gutmann, D.H.; Ponta, H.; Herrlich, P. The NF2 Tumor Suppressor Gene Product, Merlin, Mediates Contact Inhibition of Growth through Interactions with CD44. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 968–980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Singleton, P.A. Hyaluronan Regulation of Endothelial Barrier Function in Cancer. *Adv. Cancer Res.* **2014**, *123*, 191–209.
17. Riehl, T.E.; Foster, R.; Stenson, W.F. Hyaluronic Acid Is Radioprotective in the Intestine through a TLR4 and COX-2-Mediated Mechanism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2012**, *302*, G309–G316. [[CrossRef](#)]
18. Kim, Y.; Lee, Y.-S.; Hahn, J.-H.; Choe, J.; Kwon, H.J.; Ro, J.Y.; Jeoung, D. Hyaluronic Acid Targets CD44 and Inhibits FcεpsilonRI Signaling Involving PKCδ, Rac1, ROS, and MAPK to Exert Anti-Allergic Effect. *Mol. Immunol.* **2008**, *45*, 2537–2547. [[CrossRef](#)]
19. Tian, X.; Azpuru, J.; Hine, C.; Vaidya, A.; Myakishev-Rempel, M.; Ablaeva, J.; Mao, Z.; Nevo, E.; Gorbunova, V.; Seluanov, A. High-Molecular-Mass Hyaluronan Mediates the Cancer Resistance of the Naked Mole Rat. *Nature* **2013**, *499*, 346–349. [[CrossRef](#)]
20. Takeda, K.; Sakai, N.; Shiba, H.; Nagahara, T.; Fujita, T.; Kajiyama, M.; Iwata, T.; Matsuda, S.; Kawahara, K.; Kawaguchi, H.; et al. Characteristics of High-Molecular-Weight Hyaluronic Acid as a Brain-Derived Neurotrophic Factor Scaffold in Periodontal Tissue Regeneration. *Tissue Eng. Part A* **2011**, *17*, 955–967. [[CrossRef](#)]
21. Chen, M.; Li, L.; Wang, Z.; Li, P.; Feng, F.; Zheng, X. High Molecular Weight Hyaluronic Acid Regulates P. Gingivalis-Induced Inflammation and Migration in Human Gingival Fibroblasts via MAPK and NF-κB Signaling Pathway. *Arch. Oral Biol.* **2019**, *98*, 75–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Knudson, C.B. Hyaluronan Receptor-Directed Assembly of Chondrocyte Pericellular Matrix. *J. Cell Biol.* **1993**, *120*, 825–834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Nishida, Y.; Knudson, C.B.; Nietfeld, J.J.; Margulis, A.; Knudson, W. Antisense Inhibition of Hyaluronan Synthase-2 in Human Articular Chondrocytes Inhibits Proteoglycan Retention and Matrix Assembly. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 21893–21899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hashizume, M.; Mihara, M. High Molecular Weight Hyaluronic Acid Inhibits IL-6-Induced MMP Production from Human Chondrocytes by up-Regulating the ERK Inhibitor, MKP-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *403*, 184–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wang, X.; Balaji, S.; Steen, E.H.; Blum, A.J.; Li, H.; Chan, C.K.; Manson, S.R.; Lu, T.C.; Rae, M.M.; Austin, P.F.; et al. High-Molecular Weight Hyaluronan Attenuates Tubulointerstitial Scarring in Kidney Injury. *JCI Insight* **2020**, *5*, 136345. [[CrossRef](#)]
26. Jou, I.-M.; Wu, T.-T.; Hsu, C.-C.; Yang, C.-C.; Huang, J.-S.; Tu, Y.-K.; Lee, J.-S.; Su, F.-C.; Kuo, Y.-L. High Molecular Weight Form of Hyaluronic Acid Reduces Neuroinflammatory Response in Injured Sciatic Nerve via the Intracellular Domain of CD44. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2021**, *109*, 673–680. [[CrossRef](#)]
27. Torretta, S.; Marchisio, P.; Rinaldi, V.; Carioli, D.; Nazzari, E.; Pignataro, L. Endoscopic and Clinical Benefits of Hyaluronic Acid in Children with Chronic Adenoiditis and Middle Ear Disease. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **2017**, *274*, 1423–1429. [[CrossRef](#)]
28. Wang, C.-T.; Lin, Y.-T.; Chiang, B.-L.; Lin, Y.-H.; Hou, S.-M. High Molecular Weight Hyaluronic Acid Down-Regulates the Gene Expression of Osteoarthritis-Associated Cytokines and Enzymes in Fibroblast-like Synoviocytes from Patients with Early Osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **2006**, *14*, 1237–1247. [[CrossRef](#)]
29. Xu, C.; Shi, Q.; Zhang, L.; Zhao, H. High Molecular Weight Hyaluronan Attenuates Fine Particulate Matter-Induced Acute Lung Injury through Inhibition of ROS-ASK1-P38/JNK-Mediated Epithelial Apoptosis. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *59*, 190–198. [[CrossRef](#)]
30. Shi, Q.; Zhao, L.; Xu, C.; Zhang, L.; Zhao, H. High Molecular Weight Hyaluronan Suppresses Macrophage M1 Polarization and Enhances IL-10 Production in PM2.5-Induced Lung Inflammation. *Molecules* **2019**, *24*, 1766. [[CrossRef](#)]
31. Yasuda, T. Hyaluronan Inhibits Prostaglandin E2 Production via CD44 in U937 Human Macrophages. *Tohoku J. Exp. Med.* **2010**, *220*, 229–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Šafránková, B.; Hermannová, M.; Nešporová, K.; Velebný, V.; Kubala, L. Absence of Differences among Low, Middle, and High Molecular Weight Hyaluronan in Activating Murine Immune Cells In Vitro. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *107*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Galdi, F.; Pedone, C.; McGee, C.A.; George, M.; Rice, A.B.; Hussain, S.S.; Vijaykumar, K.; Boitet, E.R.; Tearney, G.J.; McGrath, J.A.; et al. Inhaled High Molecular Weight Hyaluronan Ameliorates Respiratory Failure in Acute COPD Exacerbation: A Pilot Study. *Respir. Res.* **2021**, *22*, 30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jiang, D.; Liang, J.; Noble, P.W. Hyaluronan in Tissue Injury and Repair. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **2007**, *23*, 435–461. [[CrossRef](#)]
35. Bourguignon, L.Y.W.; Ramez, M.; Gilad, E.; Singleton, P.A.; Man, M.-Q.; Crumrine, D.A.; Elias, P.M.; Feingold, K.R. Hyaluronan-CD44 Interaction Stimulates Keratinocyte Differentiation, Lamellar Body Formation/Secretion, and Permeability Barrier Homeostasis. *J. Investig. Dermatol.* **2006**, *126*, 1356–1365. [[CrossRef](#)]
36. Maytin, E.V.; Chung, H.H.; Seetharaman, V.M. Hyaluronan Participates in the Epidermal Response to Disruption of the Permeability Barrier in Vivo. *Am. J. Pathol.* **2004**, *165*, 1331–1341. [[CrossRef](#)]
37. Graça, M.F.P.; Miguel, S.P.; Cabral, C.S.D.; Correia, I.J. Hyaluronic Acid-Based Wound Dressings: A Review. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *241*, 116364. [[CrossRef](#)]

38. Tamer, T.M. Hyaluronan and Synovial Joint: Function, Distribution and Healing. *Interdiscip. Toxicol.* **2013**, *6*, 111–125. [[CrossRef](#)]
39. Dicker, K.T.; Gurski, L.A.; Pradhan-Bhatt, S.; Witt, R.L.; Farach-Carson, M.C.; Jia, X. Hyaluronan: A Simple Polysaccharide with Diverse Biological Functions. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 1558–1570. [[CrossRef](#)]
40. Wohlrab, J.; Wohlrab, D.; Neubert, R.H.H. Comparison of Noncross-Linked and Cross-Linked Hyaluronic Acid with Regard to Efficacy of the Proliferative Activity of Cutaneous Fibroblasts and Keratinocytes in Vitro. *J. Cosmet. Dermatol.* **2013**, *12*, 36–40. [[CrossRef](#)]
41. Duran-Reynals, F. The effect of extracts of certain organs from normal and immunized animals on the infecting power of vaccine virus. *J. Exp. Med.* **1929**, *50*, 327–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Stern, R.; Asari, A.A.; Sugahara, K.N. Hyaluronan Fragments: An Information-Rich System. *Eur. J. Cell Biol.* **2006**, *85*, 699–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Afify, A.M.; Stern, M.; Guntenhöner, M.; Stern, R. Purification and Characterization of Human Serum Hyaluronidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *305*, 434–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Frost, G.I.; Csóka, A.B.; Wong, T.; Stern, R.; Csóka, T.B. Purification, Cloning, and Expression of Human Plasma Hyaluronidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *236*, 10–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lepperdinger, G.; Strobl, B.; Kreil, G. HYAL2, a Human Gene Expressed in Many Cells, Encodes a Lysosomal Hyaluronidase with a Novel Type of Specificity. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22466–22470. [[CrossRef](#)]
46. Strobl, B.; Wechselberger, C.; Beier, D.R.; Lepperdinger, G. Structural Organization and Chromosomal Localization of Hyal2, a Gene Encoding a Lysosomal Hyaluronidase. *Genomics* **1998**, *53*, 214–219. [[CrossRef](#)]
47. Lin, Y.; Kimmel, L.H.; Myles, D.G.; Primakoff, P. Molecular Cloning of the Human and Monkey Sperm Surface Protein PH-20. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10071–10075. [[CrossRef](#)]
48. Kaneiwa, T.; Mizumoto, S.; Sugahara, K.; Yamada, S. Identification of Human Hyaluronidase-4 as a Novel Chondroitin Sulfate Hydrolase That Preferentially Cleaves the Galactosaminidic Linkage in the Trisulfated Tetrasaccharide Sequence. *Glycobiology* **2010**, *20*, 300–309. [[CrossRef](#)]
49. Monzón, M.E.; Manzanares, D.; Schmid, N.; Casalino-Matsuda, S.M.; Forteza, R.M. Hyaluronidase Expression and Activity Is Regulated by Pro-Inflammatory Cytokines in Human Airway Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2008**, *39*, 289–295. [[CrossRef](#)]
50. Nikitovic, D.; Berdiaki, A.; Galbiati, V.; Kavasi, R.-M.; Papale, A.; Tsatsakis, A.; Tzanakakis, G.N.; Corsini, E. Hyaluronan Regulates Chemical Allergen-Induced IL-18 Production in Human Keratinocytes. *Toxicol. Lett.* **2015**, *232*, 89–97. [[CrossRef](#)]
51. Bourguignon, L.Y.W.; Singleton, P.A.; Diedrich, F.; Stern, R.; Gilad, E. CD44 Interaction with Na⁺-H⁺ Exchanger (NHE1) Creates Acidic Microenvironments Leading to Hyaluronidase-2 and Cathepsin B Activation and Breast Tumor Cell Invasion. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 26991–27007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Stern, R. Hyaluronan Catabolism: A New Metabolic Pathway. *Eur. J. Cell Biol.* **2004**, *83*, 317–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Yoshida, H.; Nagaoka, A.; Kusaka-Kikushima, A.; Tobiishi, M.; Kawabata, K.; Sayo, T.; Sakai, S.; Sugiyama, Y.; Enomoto, H.; Okada, Y.; et al. KIAA.A1199, a Deafness Gene of Unknown Function, Is a New Hyaluronan Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 5612–5617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. De Vega, S.; Yoshida, H.; Okada, Y. Expression and Characterization of Hyaluronan-Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization: HYBID, Alias KIAA1199 and CEMIP. *Methods Mol. Biol.* **2020**, *2132*, 129–138. [[CrossRef](#)]
55. Yoshida, H.; Aoki, M.; Komiya, A.; Endo, Y.; Kawabata, K.; Nakamura, T.; Sakai, S.; Sayo, T.; Okada, Y.; Takahashi, Y. HYBID (Alias KIAA1199/CEMIP) and Hyaluronan Synthase Coordinately Regulate Hyaluronan Metabolism in Histamine-Stimulated Skin Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 2483–2494. [[CrossRef](#)]
56. Soltés, L.; Mendichi, R.; Kogan, G.; Schiller, J.; Stankovska, M.; Arnhold, J. Degradative Action of Reactive Oxygen Species on Hyaluronan. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 659–668. [[CrossRef](#)]
57. Chen, H.; Qin, J.; Hu, Y. Efficient Degradation of High-Molecular-Weight Hyaluronic Acid by a Combination of Ultrasound, Hydrogen Peroxide, and Copper Ion. *Molecules* **2019**, *24*, 617. [[CrossRef](#)]
58. Konno, K.; Arai, H.; Motomiya, M.; Nagai, H.; Ito, M.; Sato, H.; Satoh, K. A Biochemical Study on Glycosaminoglycans (Mucopolysaccharides) in Emphysematous and in Aged Lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1982**, *126*, 797–801. [[CrossRef](#)]
59. Vignola, A.M.; Chanez, P.; Campbell, A.M.; Souques, F.; Lebel, B.; Enander, I.; Bousquet, J. Airway Inflammation in Mild Intermittent and in Persistent Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1998**, *157*, 403–409. [[CrossRef](#)]
60. Scheibner, K.A.; Lutz, M.A.; Boodoo, S.; Fenton, M.J.; Powell, J.D.; Horton, M.R. Hyaluronan Fragments Act as an Endogenous Danger Signal by Engaging TLR2. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 1272–1281. [[CrossRef](#)]
61. Taylor, K.R.; Yamasaki, K.; Radek, K.A.; Di Nardo, A.; Goodarzi, H.; Golenbock, D.; Beutler, B.; Gallo, R.L. Recognition of Hyaluronan Released in Sterile Injury Involves a Unique Receptor Complex Dependent on Toll-like Receptor 4, CD44, and MD-2. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 18265–18275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Pióciennikowska, A.; Hromada-Judycka, A.; Borzęcka, K.; Kwiatkowska, K. Co-Operation of TLR4 and Raft Proteins in LPS-Induced pro-Inflammatory Signaling. *Cell Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 557–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Campo, G.M.; Avenoso, A.; Campo, S.; D'Ascola, A.; Nastasi, G.; Calatroni, A. Molecular Size Hyaluronan Differently Modulates Toll-like Receptor-4 in LPS-Induced Inflammation in Mouse Chondrocytes. *Biochimie* **2010**, *92*, 204–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

64. Campo, G.M.; Avenoso, A.; D'Ascola, A.; Prestipino, V.; Scuruchi, M.; Nastasi, G.; Calatroni, A.; Campo, S. Inhibition of Hyaluronan Synthesis Reduced Inflammatory Response in Mouse Synovial Fibroblasts Subjected to Collagen-Induced Arthritis. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *518*, 42–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Gariboldi, S.; Palazzo, M.; Zanolbio, L.; Selleri, S.; Sommariva, M.; Sfondrini, L.; Cavicchini, S.; Balsari, A.; Rumio, C. Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Increases the Self-Defense of Skin Epithelium by Induction of Beta-Defensin 2 via TLR2 and TLR4. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 2103–2110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Stern, R.; Jedrzejewski, M.J. Hyaluronidases: Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action. *Chem Rev.* **2006**, *106*, 818–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Østerholt, H.C.D.; Dannevig, L.; Wyckoff, M.H.; Liao, J.; Akgul, Y.; Ramgopal, M.; Mija, D.S.; Cheong, N.; Longoria, C.; Mahendroo, M.; et al. Antioxidant Protects against Increases in Low Molecular Weight Hyaluronan and Inflammation in Asphyxiated Newborn Pigs Resuscitated with 100% Oxygen. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38839. [[CrossRef](#)]
68. Mascarenhas, M.M.; Day, R.M.; Ochoa, C.D.; Choi, W.-I.; Yu, L.; Ouyang, B.; Garg, H.G.; Hales, C.A.; Quinn, D.A. Low Molecular Weight Hyaluronan from Stretched Lung Enhances Interleukin-8 Expression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2004**, *30*, 51–60. [[CrossRef](#)]
69. Nettelblad, O.; Bergh, J.; Schenholm, M.; Tengblad, A.; Hällgren, R. Accumulation of Hyaluronic Acid in the Alveolar Interstitial Tissue in Bleomycin-Induced Alveolitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1989**, *139*, 759–762. [[CrossRef](#)]
70. Nettelblad, O.; Tengblad, A.; Hällgren, R. Lung Accumulation of Hyaluronan Parallels Pulmonary Edema in Experimental Alveolitis. *Am. J. Physiol.* **1989**, *257*, L379–L384. [[CrossRef](#)]
71. Nettelblad, O.; Lundberg, K.; Tengblad, A.; Hällgren, R. Accumulation of Hyaluronan in Bronchoalveolar Lavage Fluid Is Independent of Iron-, Complement- and Granulocyte-Depletion in Bleomycin-Induced Alveolitis in the Rat. *Eur. Respir. J.* **1990**, *3*, 765–771. [[PubMed](#)]
72. Zhong, X.; Bai, J.; Shi, H.; Wu, C.; Liang, G.; Feng, Z. An experimental study on airway inflammation and remodeling in a rat model of chronic bronchitis and emphysema. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* **2003**, *26*, 750–755. [[PubMed](#)]
73. Dentener, M.A.; Vernooij, J.H.J.; Hendriks, S.; Wouters, E.F.M. Enhanced Levels of Hyaluronan in Lungs of Patients with COPD: Relationship with Lung Function and Local Inflammation. *Thorax* **2005**, *60*, 114–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. McKee, C.M.; Penno, M.B.; Cowman, M.; Burdick, M.D.; Strieter, R.M.; Bao, C.; Noble, P.W. Hyaluronan (HA) Fragments Induce Chemokine Gene Expression in Alveolar Macrophages. The Role of HA Size and CD44. *J. Clin. Investig.* **1996**, *98*, 2403–2413. [[CrossRef](#)]
75. Adam, D.; Perotin, J.-M.; Lebargy, F.; Birembaut, P.; Deslée, G.; Coraux, C. Regeneration of airway epithelium. *Rev. Mal. Respir.* **2014**, *31*, 300–311. [[CrossRef](#)]
76. Cantor, J.O.; Shteyngart, B.; Cerreta, J.M.; Liu, M.; Armand, G.; Turino, G.M. The Effect of Hyaluronan on Elastic Fiber Injury in Vitro and Elastase-Induced Airspace Enlargement in Vivo. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **2000**, *225*, 65–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Cantor, J.O.; Cerreta, J.M.; Armand, G.; Osman, M.; Turino, G.M. The Pulmonary Matrix, Glycosaminoglycans and Pulmonary Emphysema. *Connect. Tissue Res.* **1999**, *40*, 97–104. [[CrossRef](#)]
78. Zhao, H.; Ma, Y.; Zhang, L. Low-Molecular-Mass Hyaluronan Induces Pulmonary Inflammation by up-Regulation of Mcl-1 to Inhibit Neutrophil Apoptosis via PI3K/Akt1 Pathway. *Immunology* **2018**, *155*, 387–395. [[CrossRef](#)]
79. Horton, M.R.; Burdick, M.D.; Strieter, R.M.; Bao, C.; Noble, P.W. Regulation of Hyaluronan-Induced Chemokine Gene Expression by IL-10 and IFN-Gamma in Mouse Macrophages. *J. Immunol.* **1998**, *160*, 3023–3030.
80. Jiang, D.; Liang, J.; Li, Y.; Noble, P.W. The Role of Toll-like Receptors in Non-Infectious Lung Injury. *Cell Res.* **2006**, *16*, 693–701. [[CrossRef](#)]
81. Rayahin, J.E.; Buhrman, J.S.; Zhang, Y.; Koh, T.J.; Gemeinhart, R.A. High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Influence Macrophage Activation. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2015**, *1*, 481–493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Jiang, D.; Liang, J.; Fan, J.; Yu, S.; Chen, S.; Luo, Y.; Prestwich, G.D.; Mascarenhas, M.M.; Garg, H.G.; Quinn, D.A.; et al. Regulation of Lung Injury and Repair by Toll-like Receptors and Hyaluronan. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 1173–1179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Horton, M.R.; Olman, M.A.; Noble, P.W. Hyaluronan Fragments Induce Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Inhibit Urokinase Activity in Mouse Alveolar Macrophages: A Potential Mechanism for Impaired Fibrinolytic Activity in Acute Lung Injury. *Chest* **1999**, *116*, 17S. [[CrossRef](#)]
84. Noble, P.W.; McKee, C.M.; Cowman, M.; Shin, H.S. Hyaluronan Fragments Activate an NF-Kappa B/I-Kappa B Alpha Autoregulatory Loop in Murine Macrophages. *J. Exp. Med.* **1996**, *183*, 2373–2378. [[CrossRef](#)]
85. Yamawaki, H.; Hirohata, S.; Miyoshi, T.; Takahashi, K.; Ogawa, H.; Shinohata, R.; Demircan, K.; Kusachi, S.; Yamamoto, K.; Ninomiya, Y. Hyaluronan Receptors Involved in Cytokine Induction in Monocytes. *Glycobiology* **2009**, *19*, 83–92. [[CrossRef](#)]
86. Black, K.E.; Collins, S.L.; Hagan, R.S.; Hamblin, M.J.; Chan-Li, Y.; Hallowell, R.W.; Powell, J.D.; Horton, M.R. Hyaluronan Fragments Induce IFN β via a Novel TLR4-TRIF-TBK1-IRF3-Dependent Pathway. *J. Inflamm.* **2013**, *10*, 23. [[CrossRef](#)]
87. Sokolowska, M.; Chen, L.-Y.; Eberlein, M.; Martinez-Anton, A.; Liu, Y.; Alsaaty, S.; Qi, H.-Y.; Logun, C.; Horton, M.; Shelhamer, J.H. Low Molecular Weight Hyaluronan Activates Cytosolic Phospholipase A2 α and Eicosanoid Production in Monocytes and Macrophages. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 4470–4488. [[CrossRef](#)]
88. McKee, C.M.; Lowenstein, C.J.; Horton, M.R.; Wu, J.; Bao, C.; Chin, B.Y.; Choi, A.M.; Noble, P.W. Hyaluronan Fragments Induce Nitric-Oxide Synthase in Murine Macrophages through a Nuclear Factor KappaB-Dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 8013–8018. [[CrossRef](#)]

89. Horton, M.R.; Shapiro, S.; Bao, C.; Lowenstein, C.J.; Noble, P.W. Induction and Regulation of Macrophage Metalloelastase by Hyaluronan Fragments in Mouse Macrophages. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 4171–4176.
90. Hodge-Dufour, J.; Noble, P.W.; Horton, M.R.; Bao, C.; Wysoka, M.; Burdick, M.D.; Strieter, R.M.; Trinchieri, G.; Puré, E. Induction of IL-12 and Chemokines by Hyaluronan Requires Adhesion-Dependent Priming of Resident but Not Elicited Macrophages. *J. Immunol.* **1997**, *159*, 2492–2500.
91. Termeer, C.C.; Hennies, J.; Voith, U.; Ahrens, T.; Weiss, J.M.; Prehm, P.; Simon, J.C. Oligosaccharides of Hyaluronan Are Potent Activators of Dendritic Cells. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 1863–1870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Termeer, C.; Benedix, F.; Sleeman, J.; Fieber, C.; Voith, U.; Ahrens, T.; Miyake, K.; Freudenberg, M.; Galanos, C.; Simon, J.C. Oligosaccharides of Hyaluronan Activate Dendritic Cells via Toll-like Receptor 4. *J. Exp. Med.* **2002**, *195*, 99–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Boodoo, S.; Spannake, E.W.; Powell, J.D.; Horton, M.R. Differential Regulation of Hyaluronan-Induced IL-8 and IP-10 in Airway Epithelial Cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2006**, *291*, L479–L486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Ochoa, C.; Garg, H.; Hales, C.; Quinn, D. Low Molecular Weight Hyaluronan, via AP-1 and NF-KB Signalling, Induces IL-8 in Transformed Bronchial Epithelial Cells. *Swiss Med. Wkly.* **2011**, *141*. [[CrossRef](#)]
95. Cassatella, M.A. Neutrophil-Derived Proteins: Selling Cytokines by the Pound. *Adv. Immunol.* **1999**, *73*, s0065–s2776.
96. Jaillon, S.; Galdiero, M.R.; Del Prete, D.; Cassatella, M.A.; Garlanda, C.; Mantovani, A. Neutrophils in Innate and Adaptive Immunity. *Semin. Immunopathol.* **2013**, *35*, 377–394. [[CrossRef](#)]
97. Leonard, E.J.; Yoshimura, T. Neutrophil Attractant/Activation Protein-1 (NAP-1 [Interleukin-8]). *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1990**, *2*, 479–486. [[CrossRef](#)]
98. Kunkel, S.L.; Standiford, T.; Kasahara, K.; Strieter, R.M. Interleukin-8 (IL-8): The Major Neutrophil Chemotactic Factor in the Lung. *Exp. Lung Res.* **1991**, *17*, 17–23. [[CrossRef](#)]
99. Riise, G.C.; Ahlstedt, S.; Larsson, S.; Enander, I.; Jones, I.; Larsson, P.; Andersson, B. Bronchial Inflammation in Chronic Bronchitis Assessed by Measurement of Cell Products in Bronchial Lavage Fluid. *Thorax* **1995**, *50*, 360–365. [[CrossRef](#)]
100. Wang, Q.; Teder, P.; Judd, N.P.; Noble, P.W.; Doerschuk, C.M. CD44 Deficiency Leads to Enhanced Neutrophil Migration and Lung Injury in Escherichia Coli Pneumonia in Mice. *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 2219–2228. [[CrossRef](#)]
101. Di Stefano, A.; Caramori, G.; Gnemmi, I.; Contoli, M.; Bristol, L.; Capelli, A.; Ricciardolo, F.L.M.; Magno, F.; D’Anna, S.E.; Zanini, A.; et al. Association of Increased CCL5 and CXCL7 Chemokine Expression with Neutrophil Activation in Severe Stable COPD. *Thorax* **2009**, *64*, 968–975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Korkmaz, B.; Hajjar, E.; Kalupov, T.; Reuter, N.; Brillard-Bourdet, M.; Moreau, T.; Juliano, L.; Gauthier, F. Influence of Charge Distribution at the Active Site Surface on the Substrate Specificity of Human Neutrophil Protease 3 and Elastase. A Kinetic and Molecular Modeling Analysis. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 1989–1997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Hajjar, E.; Korkmaz, B.; Reuter, N. Differences in the Substrate Binding Sites of Murine and Human Proteinase 3 and Neutrophil Elastase. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 5685–5690. [[CrossRef](#)]
104. Scott, J.P.; Holt, D.W.; Wallwork, J. Neutrophil Elastase and Obliterative Bronchiolitis. *Transpl. Int.* **1994**, *7*, S402–S403. [[CrossRef](#)]
105. Tornling, G.; Eklund, A.; Engström-Laurent, A.; Hällgren, R.; Unge, G.; Westman, B. Hyaluronic Acid in Bronchoalveolar Lavage in Rats Exposed to Quartz. *Br. J. Ind. Med.* **1987**, *44*, 443–445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Finlay, G.A.; O’Donnell, M.D.; O’Connor, C.M.; Hayes, J.P.; FitzGerald, M.X. Elastin and Collagen Remodeling in Emphysema. A Scanning Electron Microscopy Study. *Am. J. Pathol.* **1996**, *149*, 1405–1415.
107. Scuri, M.; Abraham, W.M. Hyaluronan Blocks Human Neutrophil Elastase (HNE)-Induced Airway Responses in Sheep. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2003**, *16*, 335–340. [[CrossRef](#)]
108. Cantor, J.O.; Cerreta, J.M.; Armand, G.; Turino, G.M. Further Investigation of the Use of Intratracheally Administered Hyaluronic Acid to Ameliorate Elastase-Induced Emphysema. *Exp. Lung Res.* **1997**, *23*, 229–244. [[CrossRef](#)]
109. Cantor, J.O. Potential Therapeutic Applications of Hyaluronan in the Lung. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2007**, *2*, 283–288.
110. Liang, J.; Jiang, D.; Jung, Y.; Xie, T.; Ingram, J.; Church, T.; Degan, S.; Leonard, M.; Kraft, M.; Noble, P.W. Role of Hyaluronan and Hyaluronan-Binding Proteins in Human Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *128*, 403–411. [[CrossRef](#)]
111. Noble, P.W.; Lake, F.R.; Henson, P.M.; Riches, D.W. Hyaluronate Activation of CD44 Induces Insulin-like Growth Factor-1 Expression by a Tumor Necrosis Factor-Alpha-Dependent Mechanism in Murine Macrophages. *J. Clin. Investig.* **1993**, *91*, 2368–2377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Lagente, V.; Le Quement, C.; Boichot, E. Macrophage Metalloelastase (MMP-12) as a Target for Inflammatory Respiratory Diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* **2009**, *13*, 287–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Pandey, M.S.; Harris, E.N.; Weigel, J.A.; Weigel, P.H. The Cytoplasmic Domain of the Hyaluronan Receptor for Endocytosis (HARE) Contains Multiple Endocytic Motifs Targeting Coated Pit-Mediated Internalization. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 21453–21461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Pandey, M.S.; Harris, E.N.; Weigel, P.H. HARE-Mediated Endocytosis of Hyaluronan and Heparin Is Targeted by Different Subsets of Three Endocytic Motifs. *Int. J. Cell Biol.* **2015**, *2015*, 524707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Pandey, M.S.; Miller, C.M.; Harris, E.N.; Weigel, P.H. Activation of ERK and NF-KB during HARE-Mediated Heparin Uptake Require Only One of the Four Endocytic Motifs. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154124. [[CrossRef](#)]

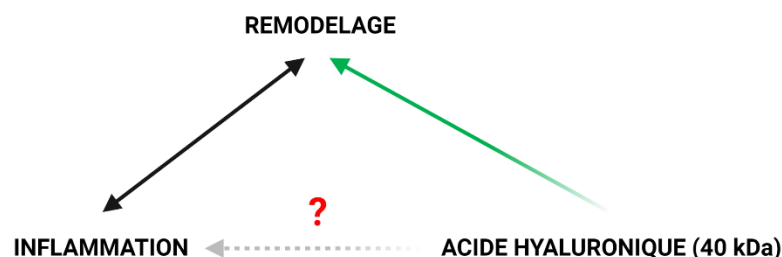
116. Pandey, M.S.; Baggenstoss, B.A.; Washburn, J.; Harris, E.N.; Weigel, P.H. The Hyaluronan Receptor for Endocytosis (HARE) Activates NF-KB-Mediated Gene Expression in Response to 40–400-KDa, but Not Smaller or Larger, Hyaluronans. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 14068–14079. [[CrossRef](#)]
117. Arbour, N.C.; Lorenz, E.; Schutte, B.C.; Zabner, J.; Kline, J.N.; Jones, M.; Frees, K.; Watt, J.L.; Schwartz, D.A. TLR4 Mutations Are Associated with Endotoxin Hyporesponsiveness in Humans. *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 187–191. [[CrossRef](#)]
118. Puchelle, E.; Gautry, P.; Brocard, O.; Bordigoni, P.; Olive, D. [Rheologic anomalies of bronchial secretion and mucociliary function in children with cystic fibrosis]. *Arch. Fr. Pediatr.* **1979**, *36*, 959–960.
119. Rogers, D.F. Mucus Pathophysiology in COPD: Differences to Asthma, and Pharmacotherapy. *Monaldi Arch. Chest Dis.* **2000**, *55*, 324–332.
120. Puchelle, E.; Bajolet, O.; Abély, M. Airway Mucus in Cystic Fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* **2002**, *3*, 115–119. [[CrossRef](#)]
121. Casalino-Matsuda, S.M.; Monzon, M.E.; Day, A.J.; Forteza, R.M. Hyaluronan Fragments/CD44 Mediate Oxidative Stress-Induced MUC5B up-Regulation in Airway Epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2009**, *40*, 277–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Lieb, T.; Forteza, R.; Salathe, M. Hyaluronin Acid in Cultured Ovine Tracheal Cells and Its Effect on Ciliary Beat Frequency in Vitro. *J. Aerosol. Med.* **2000**, *13*, 231–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Zahm, J.-M.; Milliot, M.; Breesin, A.; Coraux, C.; Birembaut, P. The Effect of Hyaluronan on Airway Mucus Transport and Airway Epithelial Barrier Integrity: Potential Application to the Cytoprotection of Airway Tissue. *Matrix Biol.* **2011**, *30*, 389–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Forteza, R.; Lieb, T.; Aoki, T.; Savani, R.C.; Conner, G.E.; Salathe, M. Hyaluronan Serves a Novel Role in Airway Mucosal Host Defense. *FASEB J.* **2001**, *15*, 2179–2186. [[CrossRef](#)]
125. Manzanares, D.; Monzon, M.-E.; Savani, R.C.; Salathe, M. Apical Oxidative Hyaluronan Degradation Stimulates Airway Ciliary Beating via RHAMM and RON. *Am. J. Respir Cell Mol. Biol.* **2007**, *37*, 160–168. [[CrossRef](#)]
126. Hall, C.L.; Wang, C.; Lange, L.A.; Turley, E.A. Hyaluronan and the Hyaluronan Receptor RHAMM Promote Focal Adhesion Turnover and Transient Tyrosine Kinase Activity. *J. Cell Biol.* **1994**, *126*, 575–588. [[CrossRef](#)]
127. Kobayashi, K.; Hernandez, L.D.; Galán, J.E.; Janeway, C.A.; Medzhitov, R.; Flavell, R.A. IRAK-M Is a Negative Regulator of Toll-like Receptor Signaling. *Cell* **2002**, *110*, 191–202. [[CrossRef](#)]
128. Lesley, J.; Gál, I.; Mahoney, D.J.; Cordell, M.R.; Rugg, M.S.; Hyman, R.; Day, A.J.; Mikecz, K. TSG-6 Modulates the Interaction between Hyaluronan and Cell Surface CD44. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 25745–25754. [[CrossRef](#)]
129. Mittal, M.; Tirupathi, C.; Nepal, S.; Zhao, Y.-Y.; Grzych, D.; Soni, D.; Prockop, D.J.; Malik, A.B. TNF α -Stimulated Gene-6 (TSG6) Activates Macrophage Phenotype Transition to Prevent Inflammatory Lung Injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E8151–E8158. [[CrossRef](#)]
130. Lauer, M.E.; Dweik, R.A.; Garantziotis, S.; Aronica, M.A. The Rise and Fall of Hyaluronan in Respiratory Diseases. *Int. J. Cell Biol.* **2015**, *2015*, 712507. [[CrossRef](#)]
131. Adam, D.; Roux-Delrieu, J.; Luczka, E.; Bonnomet, A.; Lesage, J.; Mérol, J.-C.; Polette, M.; Abély, M.; Coraux, C. Cystic Fibrosis Airway Epithelium Remodelling: Involvement of Inflammation. *J. Pathol.* **2015**, *235*, 408–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Sen, C.; Freund, D.; Gomperts, B.N. Three-Dimensional Models of the Lung: Past, Present and Future: A Mini Review. *Biochem. Soc. Trans.* **2022**, BST20190569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Mrabat, H.; Beagle, J.; Hang, Z.; Garg, H.G.; Hales, C.A.; Quinn, D.A. Inhibition of HA Synthase 3 mRNA Expression, with a Phosphodiesterase 3 Inhibitor, Blocks Lung Injury in a Septic Ventilated Rat Model. *Lung* **2009**, *187*, 233–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Ernst, G.; Lompartia, S.; Cordo Russo, R.; Gentilini, V.; Venturiello, S.; Galíndez, F.; Grynblat, P.; Hajos, S.E. Corticosteroid Administration Reduces the Concentration of Hyaluronan in Bronchoalveolar Lavage in a Murine Model of Eosinophilic Airway Inflammation. *Inflamm. Res.* **2012**, *61*, 1309–1317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Meszaros, M.; Kis, A.; Kunos, L.; Tarnoki, A.D.; Tarnoki, D.L.; Lazar, Z.; Bikov, A. The Role of Hyaluronic Acid and Hyaluronidase-1 in Obstructive Sleep Apnoea. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 19484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Gao, F.; Koenitzer, J.R.; Tobolewski, J.M.; Jiang, D.; Liang, J.; Noble, P.W.; Oury, T.D. Extracellular Superoxide Dismutase Inhibits Inflammation by Preventing Oxidative Fragmentation of Hyaluronan. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6058–6066. [[CrossRef](#)]
137. Delbrel, E.; Uzunhan, Y.; Soumare, A.; Gille, T.; Marchant, D.; Planès, C.; Boncoeur, E. ER Stress Is Involved in Epithelial-To-Mesenchymal Transition of Alveolar Epithelial Cells Exposed to a Hypoxic Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1299. [[CrossRef](#)]
138. Hashimoto, R.; Gupte, S.A. G6PD Is a Critical Enabler of Hypoxia-Induced Accumulation of Macrophages and Platelets in Mice Lungs and Contributor to Lung Inflammation. *Vascul. Pharmacol.* **2022**, *144*, 106976. [[CrossRef](#)]
139. Heinz, A. Elastases and Elastokines: Elastin Degradation and Its Significance in Health and Disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2020**, *55*, 252–273. [[CrossRef](#)]
140. Schmelzer, C.E.H.; Duca, L. Elastic Fibers: Formation, Function, and Fate during Aging and Disease. *FEBS J.* **2021**. [[CrossRef](#)]
141. Kratochvil, M.J.; Kaber, G.; Cai, P.C.; Burgener, E.B.; Barlow, G.L.; Nicolls, M.R.; Ozawa, M.G.; Regula, D.P.; Pacheco-Navarro, A.E.; Milla, C.E.; et al. Biochemical and Biophysical Characterization of Respiratory Secretions in Severe SARS-CoV-2 (COVID-19) Infections. *medRxiv* **2019**. [[CrossRef](#)]

OBJECTIFS DE LA THÈSE

La mucoviscidose est une maladie génétique rare à transmission autosomique récessive, due à des mutations du gène *CFTR* codant le canal chlore CFTR. Elle affecte différents organes sécréteurs notamment le tissu pulmonaire, générant une déshydratation, un épaississement et une accumulation de mucus qui entraîne une altération de la clairance mucociliaire. La modification du mucus favorise des infections qui deviennent chroniques dans les voies aériennes et s'accompagnent d'une inflammation pulmonaire endogène importante. Chez les patients mucoviscidosiques (CF), l'épithélium des voies aériennes est souvent lésé et remodelé, en lien avec la présence d'infection et/ou d'inflammation inhérentes à la pathologie ou à un processus de régénération dérégulé (Adam *et al.*, 2015).

En effet, les travaux précédents réalisés au sein du laboratoire ont démontré que l'AH sodique de bas poids moléculaire (40 kDa) favorisait la clairance mucociliaire en augmentant le transport du mucus par les cils et par la toux, ainsi que l'intégrité épithéliale (Zahm *et al.*, 2011). De plus, il a été démontré qu'en présence d'AH- Na^+ de 40 kDa tout au long de la régénération, l'épithélium reconstitué CF ne présente plus de remodelage épithélial en termes de hauteur épithéliale, ou de présence d'une hyperplasie des cellules basales, préalablement observé *in vitro* (thèse de Damien Adam, **Figure 25** ►) ou *in vivo* dans un modèle de xéno greffe humanisée dans la souris nude (R. Hajj *et al.*, 2007). D'autres part, il a été également démontré que sur des cultures non-CF remodelées suite à une inflammation chronique, un traitement avec l'AH- Na^+ de 40 kDa restaurait un épithélium non remodelé. Dans la mesure où le remodelage observé, tant dans les cultures CF que non-CF, est lié à l'inflammation et que l'AH- Na^+ de 40 kDa régule ce remodelage, il nous est apparu important de nous intéresser à l'influence de l'AH- Na^+ de 40 kDa sur l'inflammation des cellules épithéliales bronchique humaines, CF et non-CF.

Notre étude visait à analyser les effets de l'AH- Na^+ de 40 kDa sur la modulation de l'inflammation bronchique dans la mucoviscidose dans le but de déterminer son utilisation potentielle en tant qu'anti-inflammatoire dans cette pathologie ainsi que dans les pathologies respiratoires inflammatoires chroniques.



Thèse de Damien Adam: découverte de nouvelles molécules aux propriétés anti-remodelage et/ou pro-régénératrice

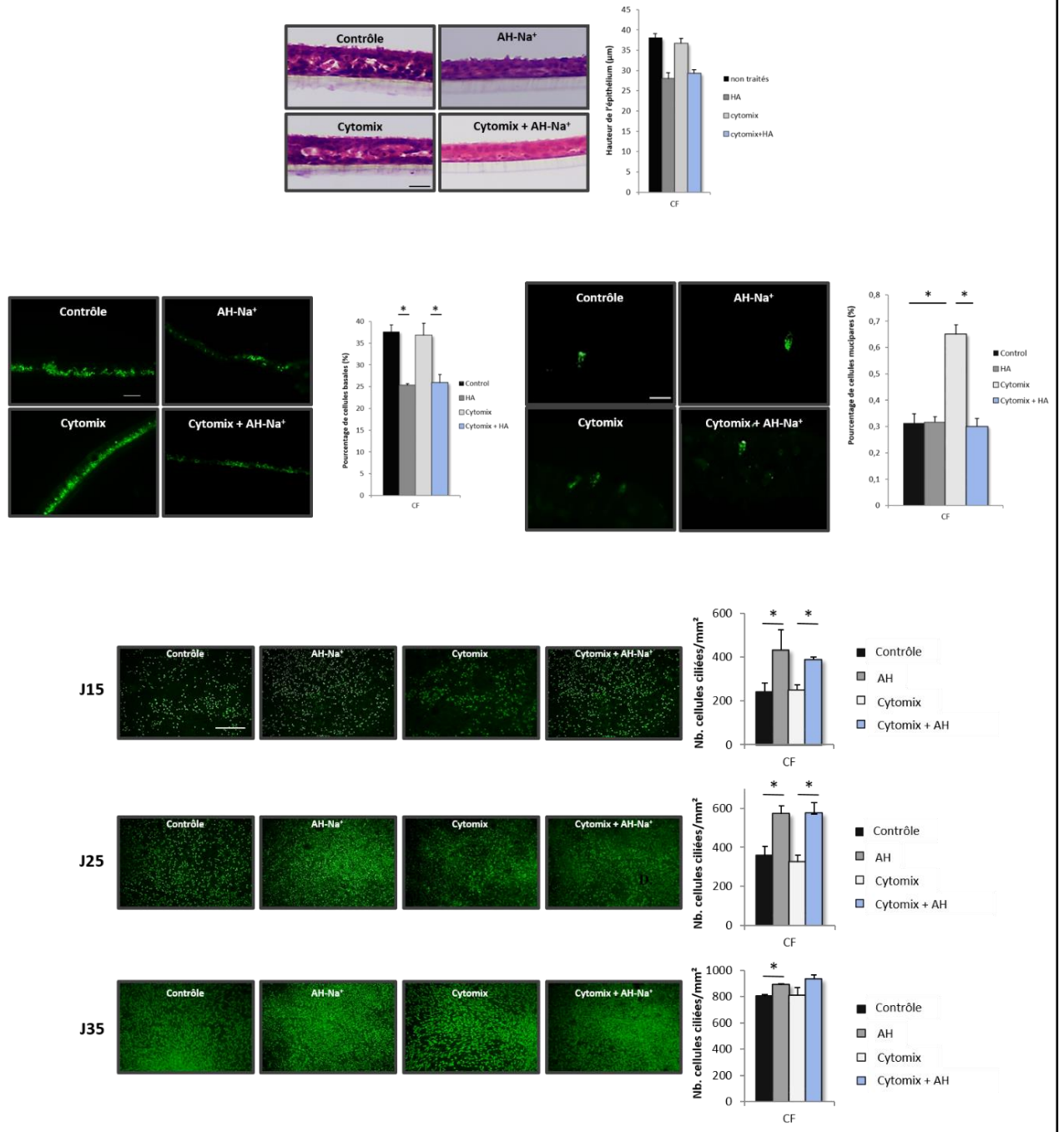


Figure 25: influence de l'AH sodique sur le remodelage et la régénération de l'épithélium CF

MATERIELS ET METHODES

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

1.1. Prélèvements humains utilisés

L'utilisation de tissus humains a été réalisée grâce à l'autorisation de collection biologique délivrée par le ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (autorisation n°DC-2016-2748), après recueil du consentement des patients, et avec l'accord n°21-775 du comité d'évaluation éthique de l'Inserm (Institutional Review Board n°IRB00003888). Les tissus ont été obtenus dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Edouard Sage, Service de Chirurgie Thoracique et Transplantation Pulmonaire de l'Hôpital Foch (Suresnes, France). Les tissus humains CF utilisés ont été collectés à la suite de transplantation pulmonaire de 9 patients CF. La médiane d'âge des patients est de 30,3 ans \pm 5,03, allant de 20 à 36 ans. Cet échantillonnage comprend 7 hommes (77,77 %) et 2 femmes (22, 23%). L'ensemble des patients possèdent un génotype F508del/F508del (mutation de classe 2/ Classe 2). Un total de 16 bronches de patients non-CF a été utilisé au cours de cette étude. Ces tissus correspondent à la recoupe d'une bronche souche de poumon de donneur de d'organe pour la greffe.

1.2. Dissociation des échantillons biologiques CF et non-CF

Les bronches CF disséquées à partir des pièces pulmonaires ainsi que les recoupes bronchiques non-CF ont été coupées en petits morceaux, lavées dans du milieu RPMI Medium 1640 (Gibco Life Technologies) contenant de l'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) puis incubées pendant une nuit à 4 °C dans du milieu RPMI/HEPES supplémenté de 0,5 mg/mL de Pronase E de *Streptomyces griseus* (Sigma Aldrich) et 1 % de Pénicilline/Streptomycine (10 000 U/mL ; Gibco). Des lambeaux d'épithélium sont récupérés après agitation mécanique des morceaux de tissu dans plusieurs bains successifs de RPMI-HEPES. L'action de la pronase est désactivée par l'ajout de Sérum de Veau Fœtal (SVF ; Gibco). Les milieux de dissociation sont ensuite collectés puis centrifugés à 200 g pendant 5 minutes à température ambiante (TA). Le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu CnT-17 (CELLnTEC) supplémenté de 1 % de Penicilline/Streptomycine. Les cellules sont comptées avec une cellule de Malassez et la viabilité cellulaire est déterminée à l'aide d'un compteur automatique ADAM™ par l'utilisation du kit de numération cellulaire AccuChip basée sur l'iodure de propidium.

1.3. Culture de cellules dissociées de résections bronchiques

Les cellules épithéliales bronchiques humaines CF et non-CF ont été ensemencées à la densité de $4 \cdot 10^4$ cellules par cm^2 en milieu CnT-17 dans des boîtes de Pétri de diamètre 100 mm préalablement recouverte avec du collagène de type IV ($16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 1 heure à 37°C) (Sigma Aldrich). La culture a été maintenue à 37°C en atmosphère humide en présence de 5 % de CO_2 . A la confluence, les cellules ont été rincées à deux reprises avec du PBS (Phosphate Buffered Saline) dépourvu de Ca^{2+} et de Mg^{2+} (Gibco) et contenant 5 mM d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique), puis détachées à l'aide d'une solution de trypsine/EDTA à 0,05 % (Gibco). Les cellules ont été reprise avec du milieu CnT17 contenant 10 % de SVF. Après une centrifugation à 200 g pendant 5 minutes à TA, le culot cellulaire a été repris dans un milieu CnT-17 et les cellules ont été comptées et ensemencées pour initier la culture en passage P1.

1.4. Lignées cellulaires bronchiques CF et non-CF

Les cellules de lignées non-CF CFBE-WT et CF CFBE-F508del (Gruenert *et al.*, 2004) ont été cultivées dans du milieu MEM (Minimum Essential Media, Gibco) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 1 % de pénicilline/ streptomycine (Gibco). Les supports de culture ont été préalablement recouverts avec du collagène de type I (Purecol[®], $18 \mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma Aldrich) pendant 1 heure à 37°C . Les cellules de lignées non-CF NuLi-1 (ATCC[®]CRL-4011) et CF CuFi-1 (ATCC[®]CRL-4013) ont été cultivées dans du milieu BEGM (Bronchial Epithelial Cell Growth Medium, Lonza), supplémenté en albumine de sérum bovin (BSA ; $100 \mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma-Aldrich) et avec 1 % pénicilline/streptomycine. Les supports de culture ont été préalablement recouverts pendant 1 heure à 37°C avec du collagène de type IV (Sigma Aldrich) préparé à une concentration de $0,2 \text{ mg}/\text{mL}$. Les cellules ont été cultivées en boîte de Pétri de 100 mm en atmosphère humide à 37°C sous 5 % CO_2 .

1.5. Culture cellulaire dans l'étude de l'inflammation cellulaire

1.5.1. Culture des lignées cellulaires bronchiques CF et non-CF

Les cellules ont été détachées par incubation avec une solution de trypsine/EDTA à 0,05 % (Gibco) avec deux rinçages successifs avec du PBS dépourvu de Ca^{2+} et de Mg^{2+} (Gibco). Les cellules ont été reprise avec leur propre milieu de culture contenant 10% de SVF. Après une centrifugation à 200 g pendant 5 minutes à TA, le culot cellulaire a été repris dans le milieu spécifique de chaque lignée cellulaire et les cellules ont été comptées. Chaque lignée cellulaire a été réensemencée dans des plaques de culture cellulaire de 48 puits ou de 24 puits (Corning[®])

préalablement recouvertes de collagène de type I ou de collagène de type IV selon la lignée cellulaire. Les cultures ont été incubées en atmosphère humide à 37°C sous 5 % CO₂.

1.5.2. Culture en monocouche des cellules épithéliales primaires bronchiques CF et non-CF

Afin d'étudier le statut inflammatoire des cellules épithéliales primaires bronchiques humaines CF et non-CF, les cellules ont étéensemencées au passage P1 dans des plaques 6 puits ou 48 puits (Corning) préalablement recouvertes de collagène de type IV (**Figure 26 ▼**). Les cellules ont été cultivées dans du milieu Cnt-17 à 37°C en atmosphère humide en présence de 5 % de CO₂. A confluence, les cellules ont été placées pendant 48 heures en milieu BEGM afin d'établir des jonctions cellulaires.

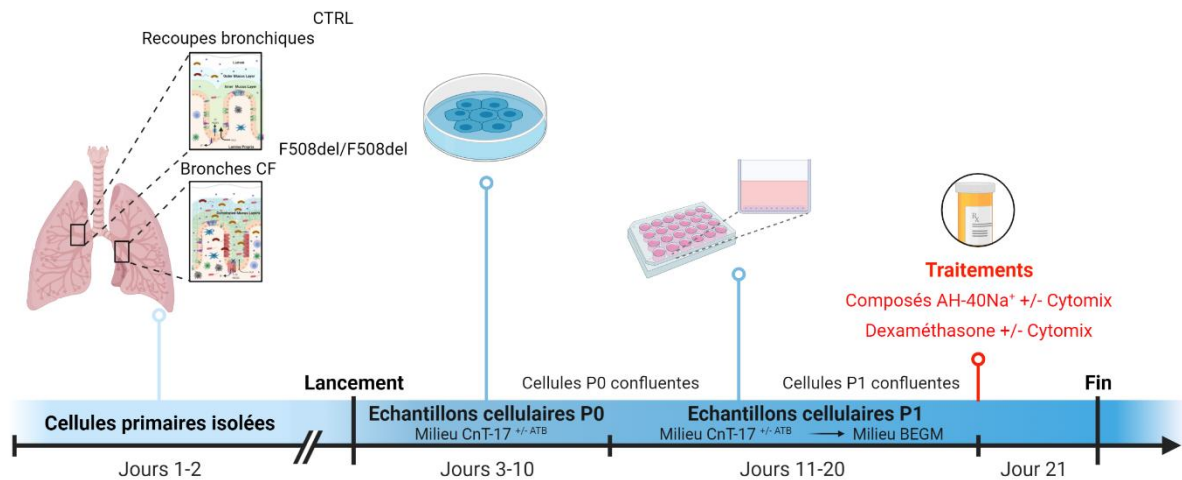


Figure 26: culture en monocouche des cellules primaires bronchiques CF et non-CF.

1.5.3. Culture en Interface Air-Liquide (IAL) des cellules épithéliales primaires bronchiques CF et non-CF

Les cellules épithéliales bronchiques CF et non-CF en passage 1 ont étéensemencées dans des chambres bi-compartmentales sur des membranes de polyester d'une porosité de 0,4 µm et de 12 mm de diamètre (Transwell clear, Corning), préalablement recouvertes de collagène de type IV à la densité de $1,5 \times 10^5$ cellules par membrane, en milieu Cnt-17. Les cellules ont été cultivées dans ce même milieu dans la chambre supérieure comme dans la chambre inférieure, jusqu'à l'obtention d'un état de confluence (**Figure 27 ►**). Lorsque les cellules ont atteint la confluence, une interface Air-Liquide a été créée en éliminant le milieu CnT-17 apical (IAL jour 0 ; IAL-0). Dans le compartiment basal, le milieu CnT-17 a été

remplacé par du milieu BEGM. Les milieux ont été renouvelés trois fois par semaine. Les cultures ont été entretenues jusqu'au jour 35 en IAL (IAL-35). Les cellules ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide avec 5 % en CO₂.

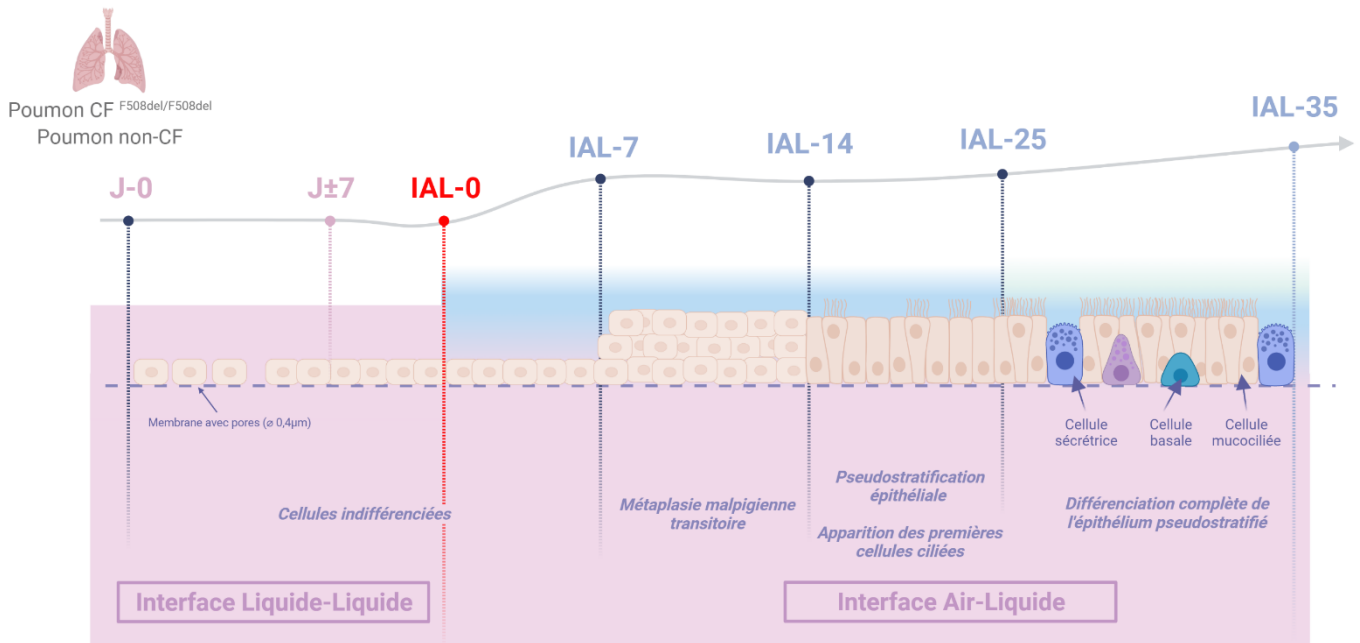


Figure 27: culture en Interface Air-Liquide des cellules primaires bronchiques CF et non-CF

2. Les traitements cellulaires

2.1. Stimulation inflammatoire des cellules en culture

Pour mimer un environnement inflammatoire, les cellules ont été soumises à un traitement par un cocktail de cytokines pro-inflammatoires appelé Cytomix, composé de TNF- α (10 ng/mL ; Sigma Aldrich), IL-1 β (10 ng/mL, Abcam) et IFN- γ (10 ng/mL, Abcam). Cette stimulation a été effectuée pendant 12 à 48 heures pour les lignés cellulaires, et pendant 24 à 48 heures (2 incubations successives de 24 heures) pour les cellules primaires bronchiques en culture en monocouche.

2.2. Préparation de l'AH-Na⁺ de 40 kDa et stimulation des cellules

L'AH-Na⁺ de 40 kDa a été fourni par l'entreprise champardennaise ARD (Pomacle, France). Il est obtenu par fermentation de la souche *Streptococcus zooepidemicus*. Le milieu utilisé comme matière première est composé d'extrait de levure, de protéines de blé et de

glucose. Le polymère est récupéré de ce bouillon de fermentation par microfiltration puis concentré par ultrafiltration et précipité par l'éthanol. Ce procédé de fabrication permet la production d'AH contenant moins de 0,1 % de protéines contaminantes. Le polymère est séché sous vide et récupéré en air stérile. Le poids moléculaire de l'AH est alors de 0,9 à 1,5 MDa. Cet AH, considéré de haut poids moléculaire, est hydrolysé par de l'acide chlorhydrique à pH = 1,8 pendant 4 heures à 80°C dans le but d'obtenir un AH de bas poids moléculaire (40 kDa). L'AH-Na⁺ de 40 kDa en poudre est conservé à 4°C à l'abri de la lumière.

Afin de compléter les milieux de culture en AH-Na⁺ de 40 kDa, la poudre a été pesée et diluée dans le milieu de culture pendant une nuit à 4°C. Après plusieurs agitations fortes de la solution, cette dernière a été filtrée sur filtre de nylon stériles (0,22 µm de porosité ; Millipore). Des milieux contenant 0,01 à 2 mg/mL d'AH-Na⁺ de 40 kDa ont été préparés.

2.3. Stimulation des cellules par la Dexaméthasone

La dexaméthasone a servi de témoin positif anti-inflammatoire. Elle a été utilisée dans le milieu de culture à la concentration de 10⁻⁶ M.

2.4. Co-traitement, traitement préventif et traitement curatif des cellules épithéliales bronchiques CF et non-CF cultivées en monocouche

L'influence de l'AH-Na⁺ de 40 kDa en traitement/co-traitement simple, en traitement préventif et en traitement curatif des cellules épithéliales bronchiques CF et non-CF sur leur sécrétion d'IL-8 a été analysée. Dans le cas du traitement/co-traitement simple, les cellules ont été incubées pendant 24 heures avec du milieu de culture contrôle supplémenté ou non en AH-Na⁺ de 40 kDa, en dexaméthasone, et en présence ou non de Cytomix. Nous avons également testé l'effet de l'AH-Na⁺ de 40 kDa en traitements préventif et curatif, avec comparaison avec la dexaméthasone (**Figure 28 ▼**). Pour définir l'effet préventif, les cellules ont d'abord été soumises à un prétraitement avec l'AH-Na⁺ de 40 kDa ou la Dexaméthasone pendant 24 heures, puis à un deuxième traitement de 24 heures, avec le milieu de culture contrôle supplémenté ou non avec du Cytomix, de l'AH-Na⁺ de 40 kDa, de la dexaméthasone ou un mélange Cytomix + AH-Na⁺ de 40 kDa ou Cytomix + dexaméthasone. Pour définir l'effet curatif, les cellules ont d'abord été soumises ou non à un prétraitement de 24 heures avec du Cytomix, suivi d'un deuxième traitement de 24 heures avec milieu de culture contrôle supplémenté ou non avec du Cytomix, de l'AH-Na⁺ de 40 kDa, de la dexaméthasone ou un mélange Cytomix + AH-Na⁺ de 40 kDa ou Cytomix + dexaméthasone.

Après incubation, les milieux de culture ont été collectés, centrifugés à 12 500 g pendant 10 minutes à 4°C et les surnageants ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les plaques de culture ont été rincées au PBS et congelées à sec à -80°C pour une extraction ultérieure des ARNs totaux ou des protéines totales.

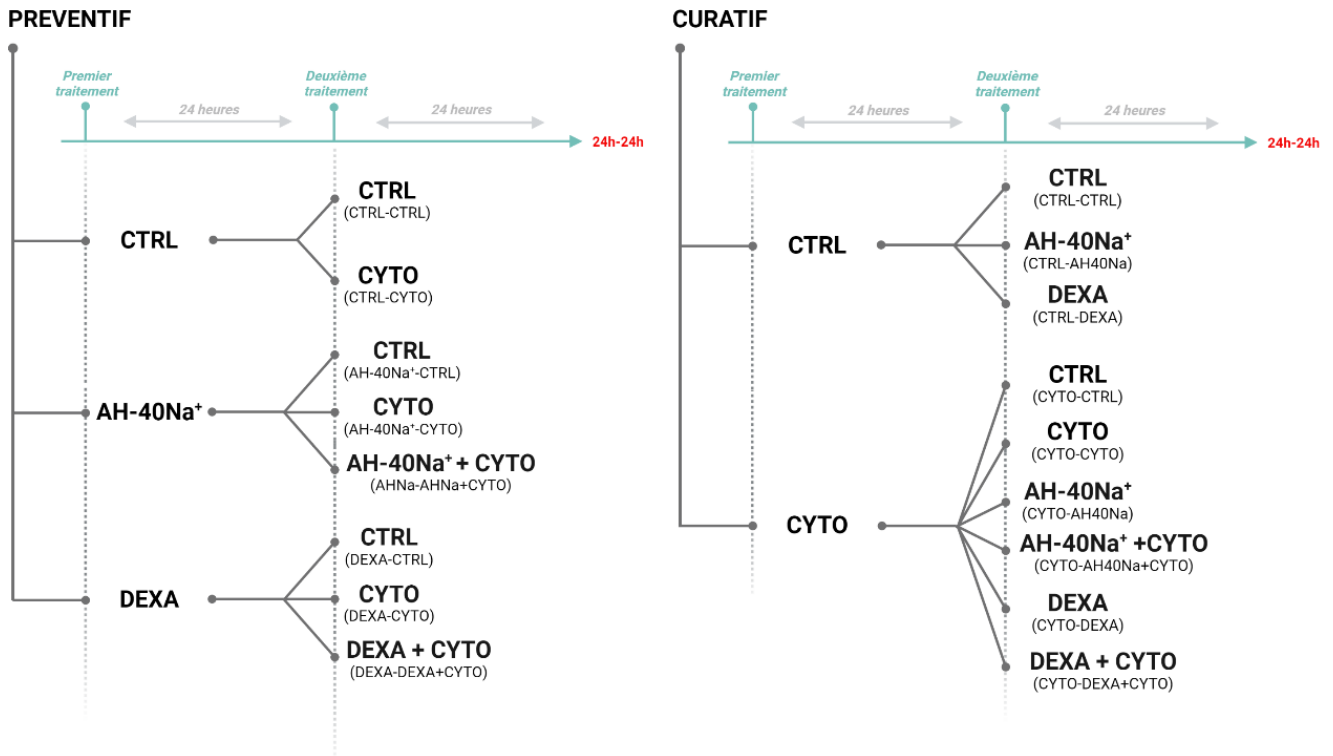


Figure 28: schéma des traitements préventifs et curatifs des cellules CF et non-CF

3. Mesure de la sécrétion de cytokines / chimiokines

3.1. ELISA anti-IL-8

Nous avons dosé la concentration en IL-8 dans les surnageants cellulaires collectés à l'aide du Human IL-8 ELISA kit (Koma Biotechnology®) selon les recommandations du fournisseur. Ce kit utilise la technique ELISA en sandwich avec un seuil de détection compris entre 15,625 et 1 000 pg/mL. Un test de dilution a été effectué préalablement à chaque quantification d'IL-8 sécrétée. Les échantillons ont été déposés en duplicat afin de s'assurer de la validité statistique des résultats. La densité optique (DO) a été mesurée à 450 nm à l'aide du spectrophotomètre optique Multiskan® EX (ThermoScientific) et les quantités d'IL-8 sécrétées ont été rapportées à une gamme d'IL-8 recombinante établie par une dilution en cascade à partir de la solution mère à 25 000 pg/mL. Les résultats des dosages sont exprimés en picogramme de protéines par mL ou en sécrétion relative d'IL-8 en comparaison aux conditions témoins.

3.2. Cytokine Array

L'étude de la sécrétion cytokinique par les cellules épithéliales bronchiques humaines primaires CF et non-CF cultivées en IAL a été réalisée à l'aide du kit Proteome Profiler Human Cytokine Array (R&D System®) selon les recommandations du fabricant. Ce kit est basé sur le principe de détection des protéines en sandwich sur membrane (**Figure 29 ▼**). Des anticorps de capture spécifiques des protéines cibles potentiellement contenues dans nos échantillons sont fixés sous forme de spots en duplicat sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées pendant 1 heure sous agitation à température ambiante dans le tampon de blocage du kit. En parallèle, 200 µL de surnageants basaux de culture en IAL sont incubés dans un cocktail d'anticorps de détection pendant 1 heure à température ambiante. Le tampon de blocage est ensuite retiré et les membranes sont incubées une nuit à 4°C sous agitation avec le mélange surnageants / anticorps de détection. Les membranes sont rincées puis incubées avec la solution de Streptavidine couplée à l'HRP (HorseRadish Peroxidase, peroxydase de Raifort) pendant 30 minutes sous agitation à température ambiante. Trois rinçages de 10 minutes sont effectués sur chaque membrane, avant une incubation pendant 1 minute, à l'abri de la lumière, en présence du réactif de chimioluminescence. Les signaux chimioluminescents obtenus sont détectés à l'aide d'un ImageQuant™ LAS-4000 munie d'une caméra CCD refroidie à -30°C (GE Healthcare). L'analyse quantitative des signaux chimioluminescents est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ. La densité des pixels présents sur chaque spot est rapportée à la densité des protéines de références incluses sur la membrane

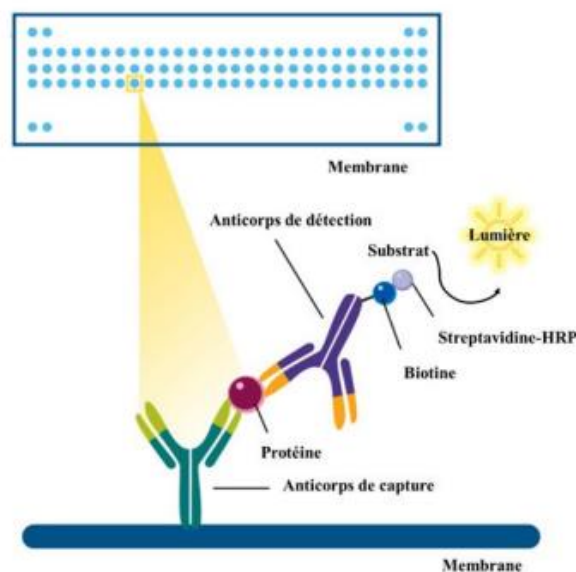


Figure 29: principe de détection des protéines par le kit Proteome Profiler Human Cytokine Array

4. Analyse de la voie NF- κ B / I κ B- α par Western-blot

4.1. Extraction des protéines totales et dosage

L'ensemble de la préparation a été effectuée sur lit de glace. Les cellules, rincées 2 fois avec du PBS, ont été lysées avec du tampon RIPA (50 mM Tris; 150 mM NaCl ; 1 % (v/v) Igepal ; 1 % (p/v) sodium déoxycholate ; 5 mM iodoacetamide ; 0,1 % (p/v) Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), pH 7,4 ; Sigma Aldrich) additionné d'inhibiteurs de protéases (Complete Mini, Roche Diagnostics GmbH). Les lysats cellulaires ont été centrifugés 10 minutes à 12 500 g à 4°C pour éliminer toute trace de débris cellulaires, et les protéines contenues dans les surnageants récupérés ont été dosées à l'aide du kit de dosage DC Protein Assay (Bio-Rad).

4.2. Western-blot

Dix microgrammes de protéines totales extraites des cultures de cellules primaires bronchiques humaines non-CF ont été réduits en présence de tampon de Laemmli 5X (60 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 40 % (v/v) Glycérol ; 10 % (v/v) Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ; 0,1 % (p/v) de bleu de bromophénol) contenant 2 % de β -mercaptoéthanol puis chauffés pendant 5 minutes à 95°C. La migration a été réalisée sur un gel SDS-PAGE à 10 % de polyacrylamide dans un tampon de migration (25 mM Tris ; 192 mM glycine ; 0,1 % SDS (v/v) ; pH 8,3 ; Biorad) à 40 mA pendant 1 heure à température ambiante. Une étape de transfert sur membrane de Polyfluorure de vinylène (PVDF ; GE Healthcare®) dans un tampon de transfert (25 mM Tris ; 192 mM glycine ; 75 mL de méthanol QSP 1 L d'H₂O) a été réalisée à 100 V, à 4°C pendant 1 heure. La membrane a ensuite été saturée dans une solution de lait écrémé à 5 % (p/v) en tampon TBS-T (Tris Buffered Saline contenant 0,1 % de Tween 20 (v/v) ; Biorad) sous agitation douce à température ambiante pendant 2 heures. La membrane a alors été incubée pendant une nuit en présence des différents anticorps primaires (**Tableau 6 ►**) dans une solution de TBS-T-lait 5 %. Après rinçage, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire correspondant à l'anticorps primaire dans une solution de TBS-T-lait 5 %. Après des derniers rinçages, la révélation a été réalisée à l'aide du kit ECLTM Prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare). L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'une caméra Amersham Imager 600 (GE Healthcare) et la quantification grâce au logiciel ImageJ. Les valeurs de DO ont été rapportées aux valeurs obtenues pour la protéine de ménage GAPDH (Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase).

Cible	Taille (kDa)	Référence	Dilution	Fournisseur	Espèce
IκB-α (C-21)	36	sc-371	1/1000	Santa Cruz	Lapin
Phospho-IκB-α (Ser32/36) (5A5)	40	#9246	1/1000	Cell Signaling	Souris
NF-κB p65 (C-20)	60-64	sc-372G	1/1000	Santa Cruz	Lapin
Phospho-NF-κB p65 (Ser536)	65	#3033	1/1000	Cell Signaling	Lapin
GAPDH	36	MAB374	1/75000	Merck	Souris
Immunoglobulines de lapin /HRP		P0217	1/2000	DakoCytomation	Lapin
Immunoglobulines de souris /HRP		P0447	1/1500	DakoCytomation	Souris

Tableau 6: anticorps utilisés pour le western-blot

5. Immunocytochimie

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre (Dutscher) préalablement recouvertes avec du collagène de type IV. Les cellules ont été rincées une fois au PBS (Gibco), avant d'être fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4 % (P/V) dans du PBS, pendant 10 minutes à température ambiante. Les lamelles portant les cultures ont été rincées à deux reprises au PBS pendant 5 minutes avant d'être saturées dans une solution PBS contenant 10% de BSA pendant 1h à température ambiante. Les cellules ont alors été incubées avec les différents anticorps primaires dilués en PBS / BSA 3 %. Après une nuit à 4°C, les lamelles ont été rincées trois fois pendant 5 minutes au PBS puis ont ensuite été incubées avec les anticorps secondaires correspondant aux anticorps primaires dilués en PBS / BSA 3 % pendant 1 heure en chambre humide à température ambiante. Les lamelles ont enfin été rincées trois fois au PBS pendant 5 minutes avant d'être incubées pendant 10 minutes avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), dilué à 300 nM dans du PBS. Après rinçage, les lamelles ont été montées sur des lames grâce à une solution anti-fading (Aqua-Poly Mount; Polysciences). Les différents anticorps utilisés sont présentés dans le tableau 7.

Cible	Référence	Dilution	Fournisseur	Espèce
CD44	ab157107	1/1000	Abcam	Lapin
TLR-4	MA5-16216	1/100	ThermoFisher	Souris
AlexaFluor® 488	A11034	1/1000	Invitrogen	GAM
AlexaFluor® 594	A11012	1/200	Invitrogen	GAR
DAPI	ab228549	1/1000	Abcam	

Tableau 7: anticorps utilisés en immunocytochimie

6. Analyse des cultures cellulaires par RT-qPCR

L'extraction des ARNs a été réalisée à l'aide du High Pure RNA Isolation Kit (Roche) selon les recommandations du fournisseur. La concentration des ARNs totaux a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (NanoDrop-1000, Thermo Scientific). Les ARNs purifiés ont été rétro-transcrits en ADN complémentaires à l'aide du Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Une quantité de 12,5 ng/puit d'ADNc a été utilisée pour la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel. La préparation du milieu réactionnel a été faite à l'aide du kit FastStart Universal Probe Master (Roche). Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 8.

Cible	Amorce sens	Amorce anti-sens	Sonde Probe®
CD44s	ACCCTACTGATGATGACGTGAG	GTGCTTGGTCTCTGGTAGCA	39
CD44 v2v10	AACACAAATGGCTGGTACGTC	TTCATCTTCATTTTCTTCATTTGG	40
CD44v3v10	GAATCCCTGCTACCAAGTACGTC	GTCAAAGCCCGTGGTGT	40
CD44v6	GGAAGAAACAGCTACCCAGAAG	GCTGTCCCTGTTGTCGAATG	FAM-CCTC{A}TGCC{A}TCTG{T}TGC-EDQ
CD44v8v10	AATCCCTGCTACCAATATGGAC	AGAGGTCCTGTCCTGTCCAA	31
GAPDH	ACCAGGTGGTCTCCTCTGAC	TGCTGTAGCCAAATTCGTTG	25
IL-8	AGACAGCAGAGCACACAAGC	ATG-GTTCCTCCGGTGGT	72

Tableau 8: liste des amorces utilisées en RT-qPCR

7. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism (GraphPad, San Diego, CA, Etats-Unis). Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm Ecart-type de la moyenne. Les moyennes ont été comparées à l'aide du test Mann-Whitney. Les résultats avec un $p \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs. La significativité est exprimée de la manière suivante : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

RESULTATS

RÉSULTATS

1. Influence de l'AH sodique de 40 kDa sur des lignées cellulaires bronchiques CF et non-CF

1.1. Analyse du phénotype inflammatoire des lignées cellulaires

Nous avons analysé le phénotype inflammatoire des lignées cellulaires CuFi-1 (n=5), NuLi-1 (n=5), CFBE-WT (n=3) et CFBE-F508del (n=3) (**Figure 30** ►) en analysant la sécrétion de la chimiokine IL-8. Nos résultats ont montré qu'il n'existe pas de sécrétion accrue de l'IL-8 par les cellules CF, CFBE-F508del (IL-8= 159,03 pg/mL) et CuFi-1 (IL-8= 663,18 pg/mL), par rapport aux cellules non-CF, CFBE-WT (IL-8= 162,62 pg/mL) et NuLi-1 (IL-8= 593,08 pg/mL), respectivement (**Figure 30 A** ►). Notre étude montre également que les lignées NuLi-1 et CuFi-1 expriment six fois plus d'IL-8 à l'état basal que les cellules CFBE-WT et CFBE-F508del. Nous pouvons noter que les lignées CFBE-WT et CFBE-F508del ne sont absolument pas stimulables : en effet, après 48 heures de traitement par le cocktail Cytomix, nous n'observons pas d'augmentation de la sécrétion d'IL-8 (IL-8= 162,29 pg/mL et 159,93 pg/mL, respectivement). A l'inverse, les cellules NuLi-1 et CuFi-1 répondent à cette stimulation par une augmentation significative de la sécrétion d'IL-8 ($p \leq 0,01$) (IL-8= 9661,18 pg/mL et 16935,32 pg/mL, respectivement). Cette expérience a été renouvelée sur un temps de 24 heures puis prolongée pendant 24 heures supplémentaires afin de vérifier le phénotype hyperenflammé des cellules CuFi-1 et NuLi-1 (**Figure 30 B** ►). Suite à la première stimulation par le Cytomix, la sécrétion d'IL-8 est augmentée. En revanche, lorsque les cellules sont incubées une seconde fois avec du milieu seul ou stimulées à nouveau par du Cytomix, on observe une diminution importante de la sécrétion d'IL-8. Il faut toutefois noter que la seconde stimulation par le cocktail Cytomix permet une augmentation significative de la sécrétion d'IL-8 par les cellules CuFi-1 par rapport à une stimulation avec du milieu seul ($p \leq 0,05$), suggérant que ces cellules CF sont plus stimulables que les cellules non-CF.

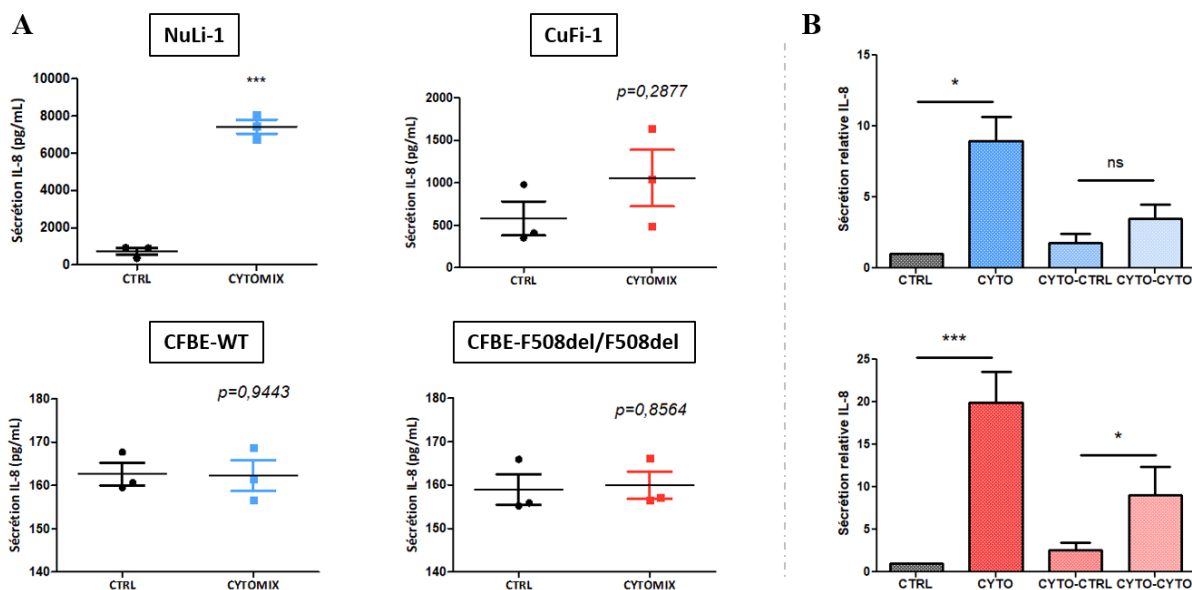


Figure 30 : analyse du phénotype inflammatoire de lignées cellulaires bronchiques.

La technique ELISA a été utilisée pour détecter et quantifier la sécrétion d’IL-8 dans les surnageants des cellules non-CF (NuLi-1 et CFBE-WT) et CF (CuFi-1 et CFBE-F508del) stimulées ou non par le cocktail pro-inflammatoire Cytomix (IL-1 β , TNF- α et IFN- γ , 10 ng/mL) pendant 48 h (A) ou pendant deux périodes de 24 h consécutives (B). CTRL : milieu contrôle ; CYTO : milieu contenant du Cytomix ; ns : non significatif

1.2. Analyse de la cinétique d’inflammation en présence ou non d’AH sodique de 40 kDa

Une cinétique d’inflammation a été réalisée sur les cellules CuFi-1 (n=5) et NuLi-1 (n=4) en présence ou en absence d’AH de 40 kDa (1 mg / mL) sous sa forme sodique, en co-traitement ou non avec le cocktail Cytomix. Pour chaque lignée cellulaire, les résultats indiquent que la sécrétion d’IL-8 est fortement stimulée dès 12 heures par le Cytomix et atteint un plateau à 36 heures et 48 heures (**Figure 31** ►). L’AH sodique de 40 kDa (AH-Na⁺) n’entraîne aucune réaction inflammatoire des cellules CuFi-1 et NuLi-1. Le co-traitement par l’AH-Na⁺ et le Cytomix permet d’observer une diminution non significative de la sécrétion d’IL-8, avec un traitement optimal au temps 24 heures pour les cellules NuLi-1 (p=0,2) et 36 heures pour les cellules CuFi-1 (p= 0,3429). Pour la suite des expériences, nous avons donc choisi un temps d’incubation de 24 heures.

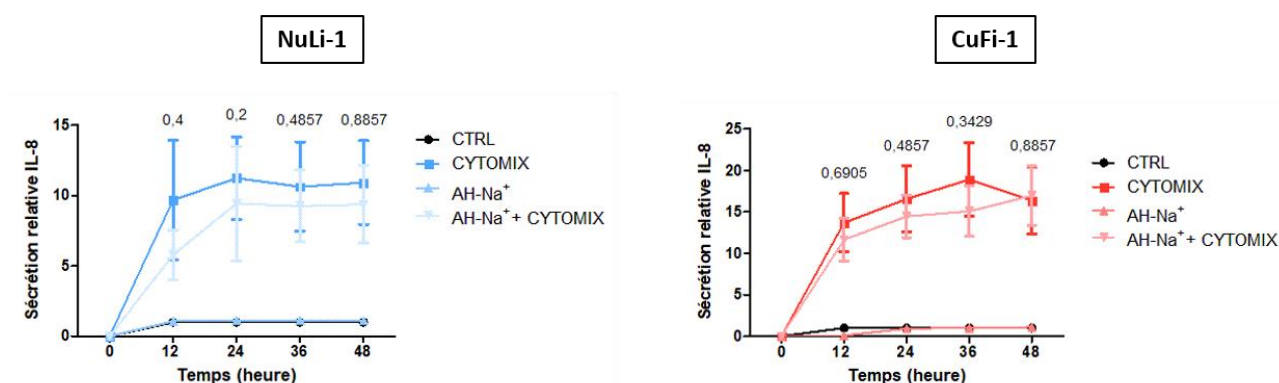


Figure 31 : cinétiques d'inflammation des lignées cellulaires bronchiques NuLi-1 et CuFi-1, et influence de l'AH-Na⁺.

Les cellules non-CF NuLi-1 et CF CuFi-1 ont été traitées ou non avec l'AH-Na⁺, en présence ou non du cocktail Cytomix. La technique ELISA a été utilisée pour détecter et quantifier la sécrétion en IL-8 dans les surnageants cellulaires aux temps 12, 24, 36 et 48 heures. CTRL : milieu contrôle ; les *p*-valeurs (Cytomix vs AH-Na⁺ + Cytomix) sont inscrits sur chaque graphique.

1.3. Analyse du rôle anti-inflammatoire potentiel de l'AH-Na⁺ de 40 kDa

Pour définir l'effet anti-inflammatoire potentiel de l'AH, les cellules NuLi-1 (n=4) et CuFi-1 (n=5) ont été prétraitées ou non avec le Cytomix pendant 24 heures, puis traitées à nouveau avec AH-Na⁺ (1 mg / mL) en présence ou non de Cytomix (**Figure 32** ►). Nos résultats indiquent que le traitement des cellules NuLi-1 et CuFi-1 par l'AH-Na⁺ seul n'exerce pas d'effet sur la sécrétion de l'IL-8. L'incubation des cellules CF ou non-CF entraîne une sécrétion augmentée non significative d'IL-8 en absence de toute autre stimulation (*p* > 0,05). En revanche, la sécrétion d'IL-8 semble différente lorsque les cellules CF ou non-CF préalablement enflammées sont co-traitées avec AH-Na⁺ et Cytomix. Même si la différence est non significative, elle semble montrer une tendance anti-inflammatoire de l'AH-Na⁺ de 40 kDa en présence du Cytomix avec une valeur *p* de 0,3750 et 0,6905 respectivement pour les cellules NuLi-1 et CuFi-1.

1.4. Analyse du rôle anti-inflammatoire préventif potentiel de l'AH-Na⁺ de 40 kDa

Pour définir l'effet anti-inflammatoire préventif potentiel de l'AH-Na⁺ de 40 kDa, les cellules NuLi-1 (n=4) et CuFi-1 (n=5) ont été prétraitées ou non par l'AH-Na⁺ (1 mg/mL) (**Figure 33** ►). À la suite de ce traitement, les cellules ont été soumises ou non à une stimulation par le cocktail Cytomix seul ou en co-traitement avec l'AH-Na⁺. Dans ces expériences, nous

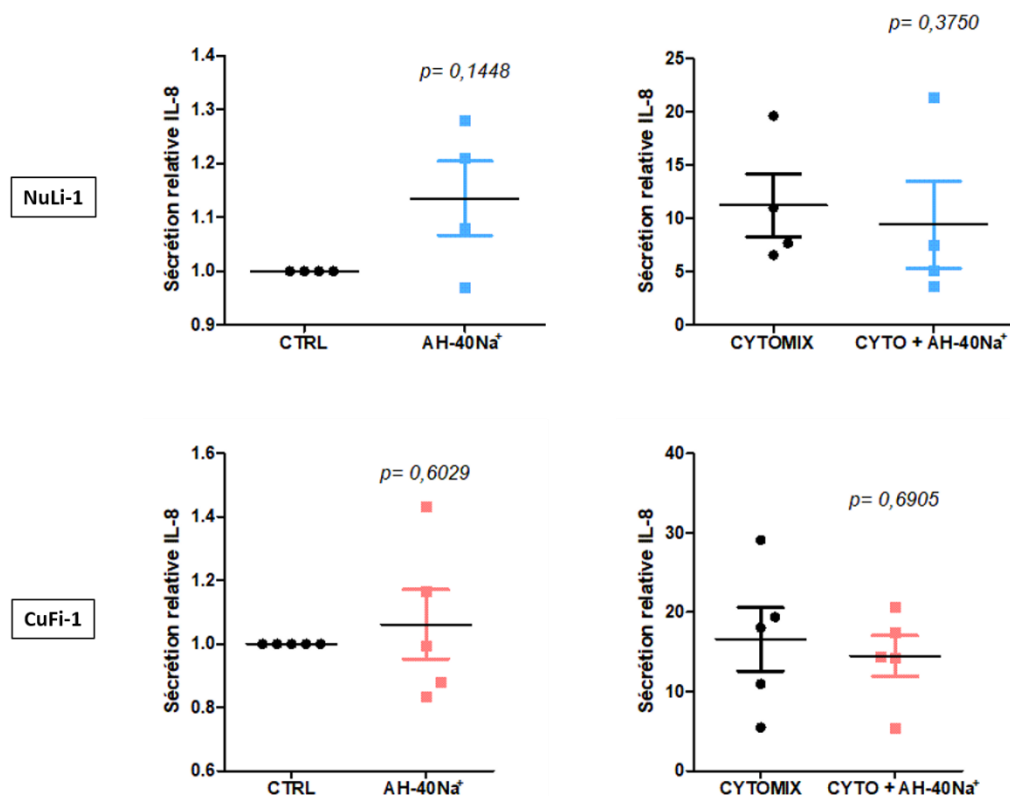


Figure 32: sécrétion de l'IL-8 par les lignées bronchiques traitées ou non par l'AH-Na⁺.

Les cellules non-CF NuLi-1 et CF CuFi-1 ont été traitées ou non par l'AH-Na⁺ en présence ou non du cocktail Cytomix. La technique ELISA a été utilisée pour détecter et quantifier la sécrétion d'IL-8 dans les surnageants cellulaires. CTRL : milieu contrôle ; CYTO : Cytomix.

avons également comparé l'effet de l'AH-Na⁺ de 40 kDa en utilisant la dexaméthasone (10^{-6} M) comme témoin positif d'activité anti-inflammatoire. La dexaméthasone en traitement préventif diminue significativement la sécrétion d'IL-8 par les cellules CuFi-1 ($p \leq 0,05$) et NuLi-1 ($p = 0,1282$) en milieu contrôle. Nos résultats indiquent que le prétraitement des cellules NuLi-1 et CuFi-1 par l'AH-Na⁺ n'exerce pas d'effet anti-inflammatoire préventif. De plus et de façon surprenante, l'incubation des cellules non-CF avec du milieu seul à la suite d'un prétraitement avec l'AH-Na⁺ entraîne une augmentation de la sécrétion d'IL-8 en absence de toute autre stimulation ($p \leq 0,05$). En revanche, la sécrétion d'IL-8 n'est pas différente lorsque les cellules CF ou non-CF sont stimulées avec du Cytomix suite à un prétraitement ou non par l'AH-Na⁺. On peut toutefois noter une diminution non significative de la sécrétion d'IL-8 lorsque les cellules sont soumises au co-traitement AH-Na⁺ et Cytomix suite à un prétraitement par l'AH-Na⁺.

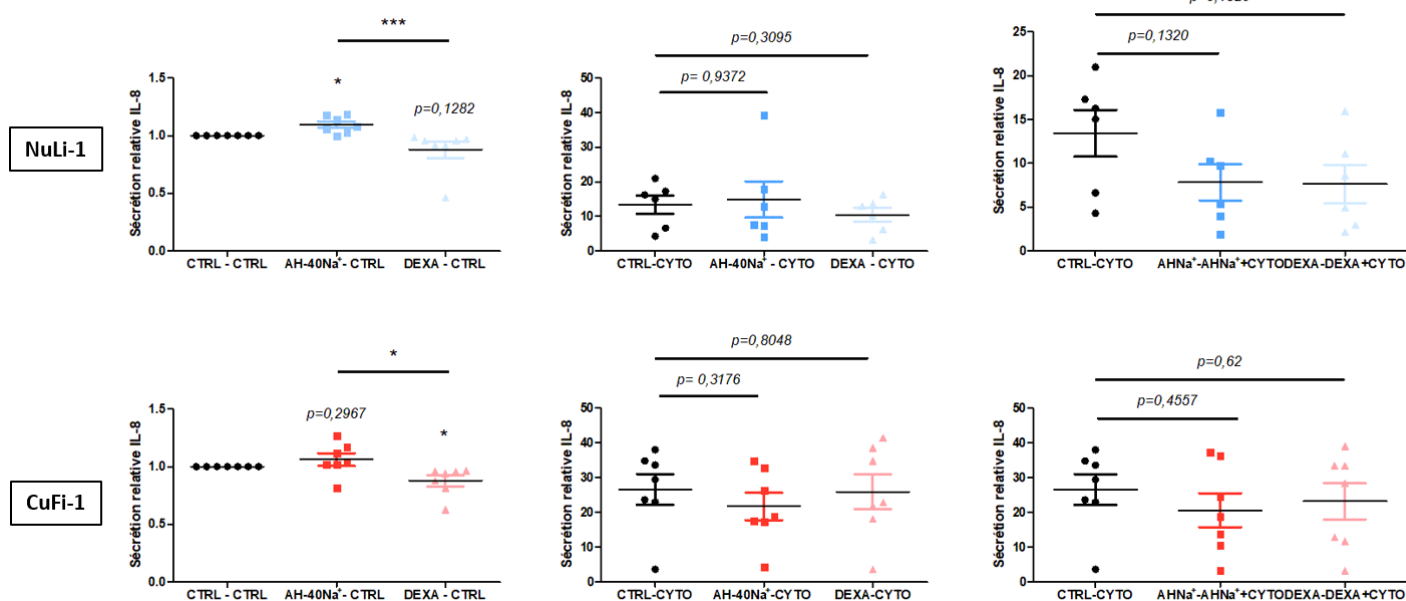


Figure 33: sécrétion de l'IL-8 par les lignées bronchiques après traitement préventif ou non par l'AH-Na⁺.

Les cellules non-CF NuLi-1 et CF CuFi-1 ont été prétraitées ou non par l'AH-Na⁺ de 40 kDa ou par la dexaméthasone pendant 24 heures avant un second traitement par du milieu contrôle ou par le cocktail pro-inflammatoire Cytomix, supplémenté ou non en AH-Na⁺ de 40 kDa ou en dexaméthasone. La technique ELISA a été utilisée pour détecter et quantifier la sécrétion d'IL-8 dans les surnageants des cellules non-CF et CF. CTRL : milieu contrôle ; DEXA : dexaméthasone ; CYTO : Cytomix.

1.5. Analyse du rôle anti-inflammatoire curatif potentiel de l'AH-Na⁺ de 40 kDa

Pour définir le rôle anti-inflammatoire curatif de l'AH-Na⁺ de 40 kDa, les cellules NuLi-1 (n=5) et CuFi-1 (n=4) ont été prétraitées ou non avec le cocktail Cytomix pendant 24 heures. À la suite de ce traitement, les cellules ont été incubées ou non avec l'AH-Na⁺ de 40 kDa (1 mg/mL) ou la dexaméthasone (10⁻⁶M), seuls ou en co-traitement avec le Cytomix (**Figure 34** ►). Dans ces expériences, nous avons utilisé la dexaméthasone comme témoin positif d'activité anti-inflammatoire. La dexaméthasone diminue significativement de la sécrétion d'IL-8 par les cellules NuLi-1 et CuFi-1 ($p \leq 0,05$). En revanche, nos résultats ne montrent aucune variation significative de la sécrétion d'IL-8 suite au traitement curatif par l'AH-Na⁺ par rapport à la condition contrôle dans les cultures CF ($p= 0,3025$) et une augmentation significative de la sécrétion d'IL-8 dans les cultures non-CF ($p \leq 0,05$), en absence de tout contexte inflammatoire initié par le Cytomix. Le prétraitement des lignées cellulaires bronchiques par le Cytomix pendant 24 heures, suivi du traitement par l'AH-Na⁺ ne permet pas d'observer d'effet pro- ou

anti-inflammatoire de l'AH-Na⁺ de 40 kDa pour les cellules NuLi-1 et CuFi-1. Cependant, il est à noter une tendance à la diminution, bien que non significative, de la sécrétion d'IL-8 lorsque le contexte inflammatoire est maintenu pour les cellules NuLi-1 et CuFi-1, que ce soit pour le traitement curatif Cytomix+AH-Na⁺ ou Cytomix + Dexaméthasone.

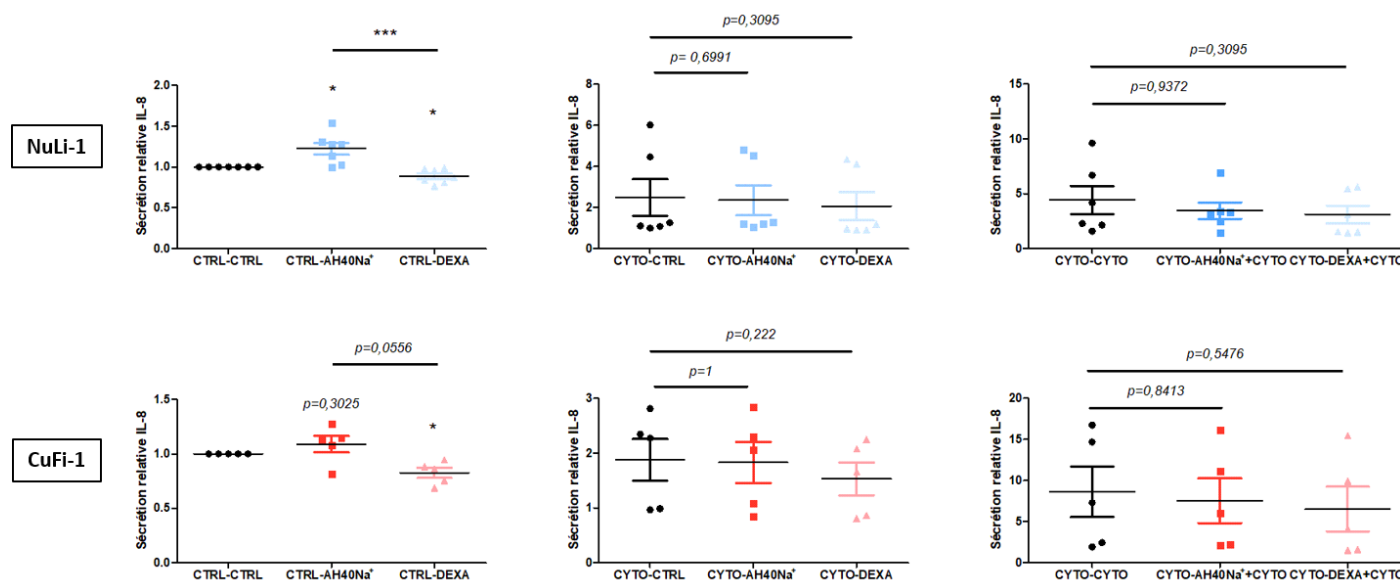


Figure 34: sécrétion de l'IL-8 par les lignées bronchiques en cas de traitement curatif par l'AH-Na⁺ de 40 kDa.

Les cellules non-CF NuLi-1 et CF CuFi-1 ont été prétraitées ou non par le cocktail de cytokines pro-inflammatoires Cytomix pendant 24 heures avant un second traitement par le milieu contrôle ou le Cytomix, supplémenté ou non en AH-40Na⁺ ou en dexaméthasone. La technique ELISA a été utilisée pour détecter et quantifier la sécrétion d'IL-8 dans les surnageants des cellules NuLi-1 et CuFi-1 à la suite du second traitement de 24 heures. CTRL : milieu contrôle ; DEXA : dexaméthasone ; CYTO : Cytomix.

1.6. Analyse de l'expression des ARNm codant l'interleukine-8 en cas de traitements préventifs et curatifs des cellules CF CuFi-1 par l'AH-Na⁺ de 40 kDa

Pour comprendre l'influence d'un traitement préventif et curatif de l'AH-Na⁺ de 40 kDa, nous nous sommes intéressés à l'expression des ARNm codant l'IL-8, par les cellules CuFi-1 (n=5) (**Figure 35** ►). Nos résultats montrent une tendance à l'augmentation de l'expression des ARNm de l'IL-8, dans la condition préventive, que ce soit par le prétraitement par l'AH-Na⁺ (p= 0,2820), la dexaméthasone (p= 0.3499), l'AH-Na⁺ + Cytomix (p= 0,1030) ou la dexaméthasone + Cytomix (p= 0,4827). De façon intéressante, nos résultats montrent, en condition curative, une augmentation de l'expression de l'IL-8 par les cellules CuFi-1

enflammées en cas de traitement par l'AH-Na⁺ ($p= 0,2665$), augmentation qui devient significative en cas de traitement des cellules enflammées par le mélange AH-Na⁺ + Cytomix ($p \leq 0,05$). Nos résultats montrent qu'il n'y a aucune diminution de l'expression des ARNm de l'IL-8, quelles que soient les conditions de culture.

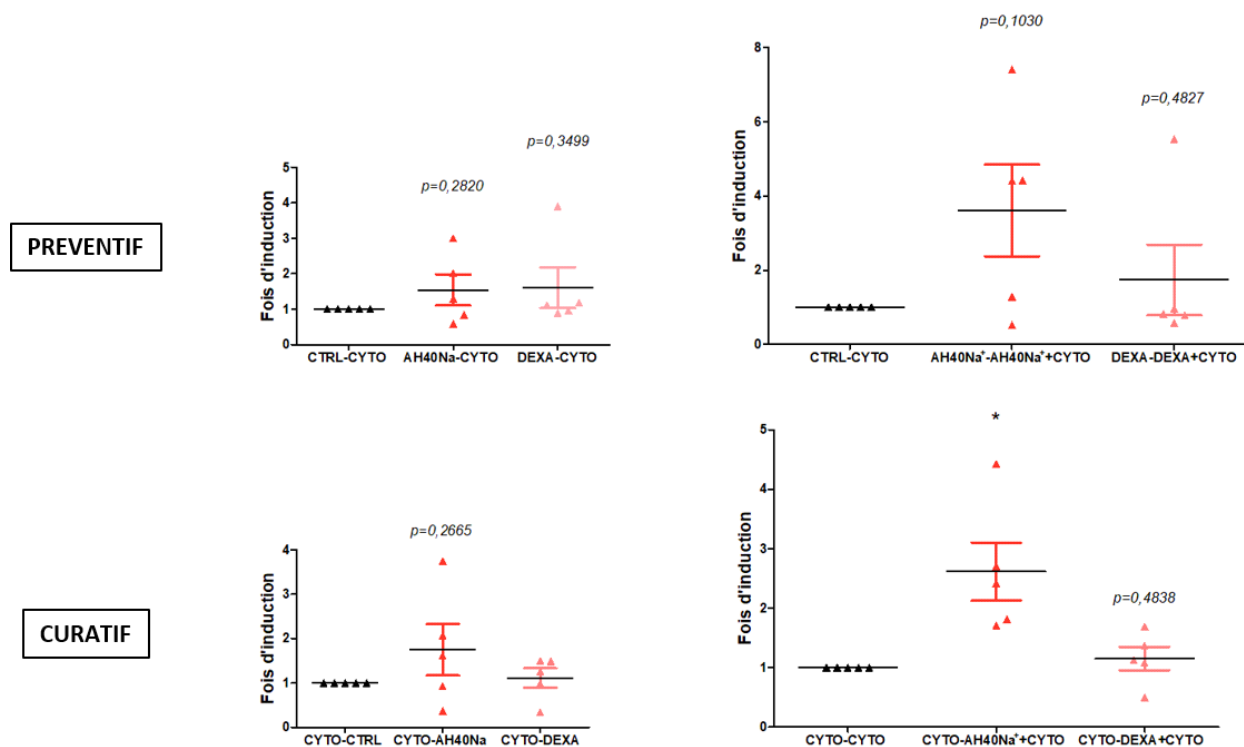


Figure 35: expression par RT-qPCR des ARNm de l'interleukine-8 en conditions de traitement préventif et curatif des cellules CF CuFi-1 par l'AH-Na⁺ de 40 kDa.

La technique de RT-qPCR a été utilisée pour détecter et quantifier les variations d'expression des ARNm de l'IL-8 dans des extraits des cellules CuFi-1 (n=5) prétraitées ou non le cocktail pro-inflammatoire Cytomix, la dexaméthasone ou l'AH-Na⁺ de 40 kDa pendant 24 heures, avant un second traitement par le milieu contrôle, le Cytomix ou la dexaméthasone, supplémentés ou non en AH-Na⁺. CTRL : milieu contrôle ; DEXA : dexaméthasone ; CYTO : Cytomix.

2. Influence de l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur des cellules primaires bronchiques humaines CF et non-CF non différenciées cultivées en monocouches

2.1. Analyse du rôle anti-inflammatoire potentiel de l'AH-Na⁺ de 40 kDa

Les cellules primaires bronchiques humaines non-CF (n = 3 à 9) et CF (F508del / F508del ; n = 4 à 8) ont été traitées ou non par l'AH-Na⁺ de 40 kDa (1 mg/mL) en présence ou non de Cytomix (**Figure 36** ►). La dexaméthasone (10⁻⁶ M) a servi de contrôle positif d'effet anti-inflammatoire. Nos résultats indiquent que le traitement des cellules non-CF par l'AH-Na⁺ seul

entraîne une augmentation non significative de la sécrétion d'IL-8, tout comme la dexaméthasone. Dans les cultures CF, une baisse est observée, qui reste non significative. En revanche, les effets sont différents lorsque les cellules CF ou non-CF sont dans un environnement inflammatoire. Le traitement des cellules CF et non-CF par la dexaméthasone en présence de Cytomix permet d'observer un effet anti-inflammatoire de ce composé sur la sécrétion en IL-8 de ces cellules ($p \leq 0,005$). De plus, le traitement des cellules CF et non-CF par l'AH- Na^+ permet de mettre en évidence un effet anti-inflammatoire de l'AH de 40 kDa dans un contexte enflammé (cellules CF, $p \leq 0,01$; cellules non-CF, $p \leq 0,001$).

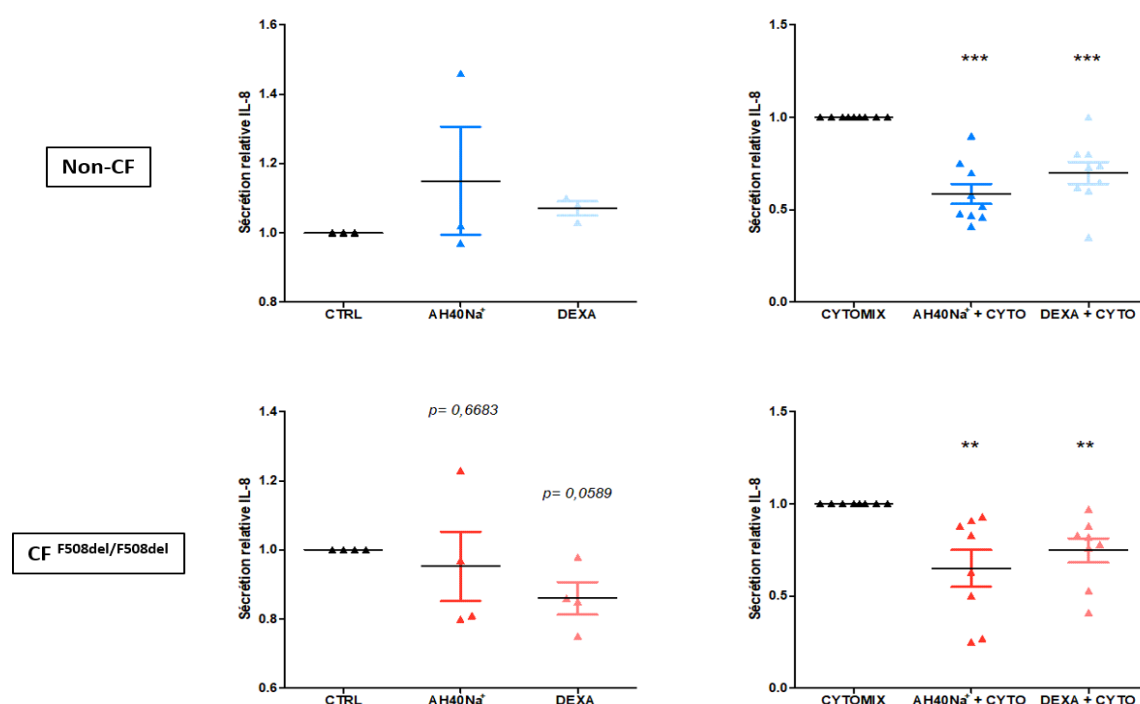


Figure 36: sécrétion de l'IL-8 par les cellules primaires bronchiques CF et non-CF traitées ou non par l'AH- Na^+ de 40 kDa.

Les cellules primaires bronchiques non-CF et CF ont été traitées par l'AH- Na^+ , ou la Dexaméthasone, en présence ou non de Cytomix. La technique ELISA a été utilisée pour détecter et quantifier la sécrétion d'IL-8 dans les surnageants des cellules non-CF et CF.

2.2. Analyse du rôle anti-inflammatoire préventif potentiel de l'AH sodique de 40 kDa

Pour définir l'effet anti-inflammatoire préventif potentiel de l'AH- Na^+ de 40 kDa, les cellules primaires épithéliales bronchiques humaines CF (F508del / F508del ; $n = 4$) et non-CF ($n = 4$ à 7) ont été prétraitées ou non par l'AH- Na^+ (1 mg/mL). À la suite de ce traitement, les cellules ont été soumises ou non à une stimulation par le cocktail Cytomix seul ou en co-traitement avec l'AH- Na^+ . La dexaméthasone (10^{-6} M) a servi de témoin positif d'activité anti-

inflammatoire (**Figure 37** ►). Les prétraitements des cellules primaires par l’AH- Na^+ et la dexaméthasone n’exercent aucun effet sur la sécrétion d’IL-8 en milieu contrôle par les cellules épithéliales bronchiques humaines (Cellules non-CF : $p=0,8011$ et $p=0,8792$, respectivement ; Cellules CF : $p=0,4885$ et $p=0,5748$, respectivement). Le prétraitement des cellules non-CF par l’AH- Na^+ ou la dexaméthasone n’entraîne aucune variation de la sécrétion d’IL-8 après une stimulation par le Cytomix ($p=0,9114$ et $p=0,3523$, respectivement) et ne permet pas d’observer d’effet anti-inflammatoire préventif. De la même façon, le prétraitement des cellules CF par l’AH- Na^+ et la dexaméthasone entraîne une variation non significative de la sécrétion d’IL-8 après une stimulation par le Cytomix ($p=0,4174$ et $p=0,4038$, respectivement).

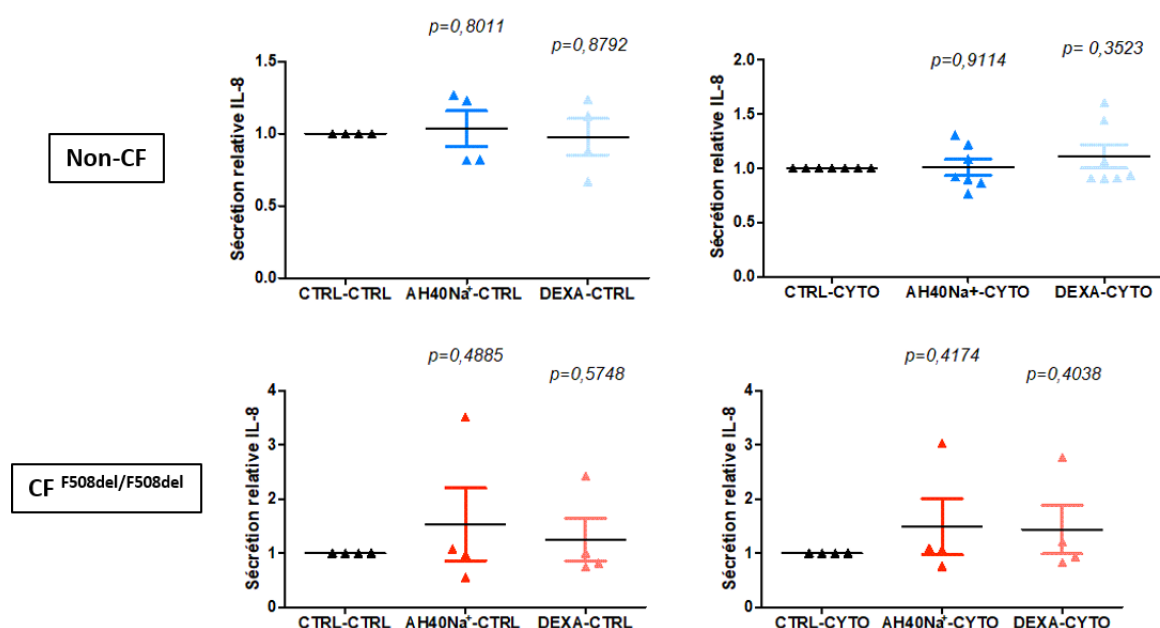


Figure 37: sécrétion de l’IL-8 par les cellules primaires épithéliales bronchiques humaines après traitement préventif ou non par l’AH- Na^+ .

Les cellules épithéliales bronchiques non-CF et CF ont été prétraitées ou non par l’AH- Na^+ de 40 kDa ou par la dexaméthasone pendant 24 heures avant un second traitement par du milieu contrôle ou par le cocktail pro-inflammatoire Cytomix, supplémenté ou non en AH- Na^+ de 40 kDa ou en dexaméthasone. La technique ELISA a été utilisée pour détecter et quantifier la sécrétion d’IL-8 dans les surnageants des cellules non-CF et CF. CTRL : milieu contrôle ; DEXA : dexaméthasone ; CYTO : Cytomix.

2.3. Analyse du rôle anti-inflammatoire curatif potentiel de l’AH sodique de 40 kDa

Pour définir le rôle anti-inflammatoire curatif potentiel de l’AH- Na^+ de 40 kDa, les cellules épithéliales bronchiques primaires humaines CF (n = 7) et non-CF (n = 9) ont été prétraitées ou non avec le cocktail Cytomix pendant 24 heures. À la suite de ce traitement, les cellules enflammées ont été incubées ou non avec l’AH- Na^+ (1 mg/mL) ou la dexaméthasone (10^{-6} M)

en présence de Cytomix (**Figure 38** ►). Nos résultats montrent une diminution significative de la sécrétion d'IL-8 suite au traitement curatif par la Dexaméthasone par rapport à la condition contrôle d'inflammation initiée par le Cytomix, que ce soit dans les cultures non-CF ($p \leq 0,01$) ou CF ($p \leq 0,05$). De plus, il est à noter que l'AH- Na^+ de 40 kDa exerce un effet anti-inflammatoire curatif en diminuant la sécrétion de l'IL-8 par les cellules CF ($p \leq 0,001$) et non-CF ($p \leq 0,05$). Pour les cellules non-CF, nos résultats démontrent une action anti-inflammatoire plus importante de l'AH- Na^+ de 40 kDa sur les cellules non-CF, en comparaison à la dexaméthasone.

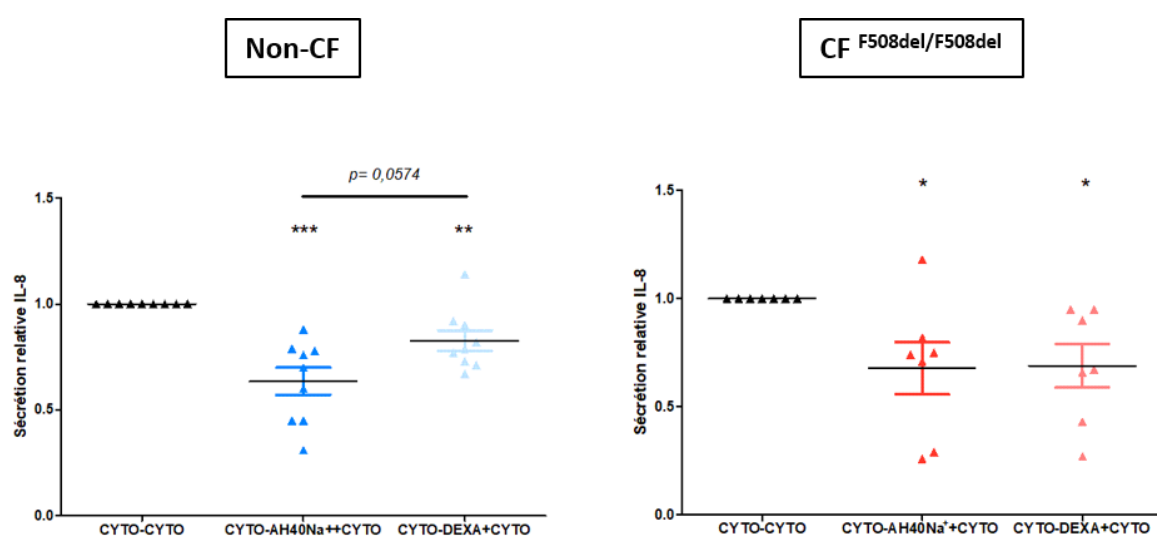


Figure 38: sécrétion de l'IL-8 par les cellules primaires bronchiques CF et non-CF en cas de traitement curatif par l'AH- Na^+ de 40 kDa.

Les cellules primaires bronchiques non-CF et CF cultivées en monocouche ont été prétraitées par le cocktail de cytokines pro-inflammatoires Cytomix pendant 24 heures avant un second traitement par le milieu contrôle ou le Cytomix, supplémenté ou non en AH-40 Na^+ ou en dexaméthasone. La technique ELISA a été utilisée pour détecter et quantifier la sécrétion d'IL-8 dans les surnageants des cellules primaires à la suite du second traitement de 24 heures. CTRL : milieu contrôle ; DEXA : dexaméthasone ; CYTO : Cytomix.

3. Influence de l'AH- Na^+ de 40 kDa sur des cellules primaires bronchiques humaines CF en culture en interface air-liquide

3.1. Analyse du rôle anti-inflammatoire potentiel de l'AH- Na^+ de 40 kDa

Nous nous sommes intéressés à l'influence de l'AH- Na^+ de 40 kDa sur la sécrétion de l'IL-8 par les cellules primaires bronchiques humaines CF en cours de différenciation en utilisant un modèle de culture 3D en interface air-liquide (IAL). Pour ce faire, nous avons traité ou non les cellules à partir de l'établissement de l'interface air-liquide (IAL-J0) et jusqu'à IAL-

J7 (n = 7) et IAL-J15 (n = 5) avec de l'AH-Na⁺ de 40 kDa (1 mg/mL) dans la chambre basale. IAL J7 et IAL J15 représentent, respectivement, un stade non différencié des cellules en IAL et le premier stade de différenciation des cellules basales en cellules ciliées. Nous avons analysé les variations de sécrétions d'IL-8 par les cellules primaires bronchiques humaines dans la chambre basale par ELISA (**Figure 39 ▼**). L'AH-Na⁺ de 40 kDa diminue de manière significative la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales bronchiques CF à IAL-J7 ($p \leq 0,05$) et à IAL-J15 ($p \leq 0,01$). Ces données indiquent un effet de l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur la sécrétion vectorisée d'IL-8 par les cellules primaires bronchiques CF cultivées en IAL, sans nécessité d'un contexte inflammatoire et indépendamment du stade de différenciation épithéliale.

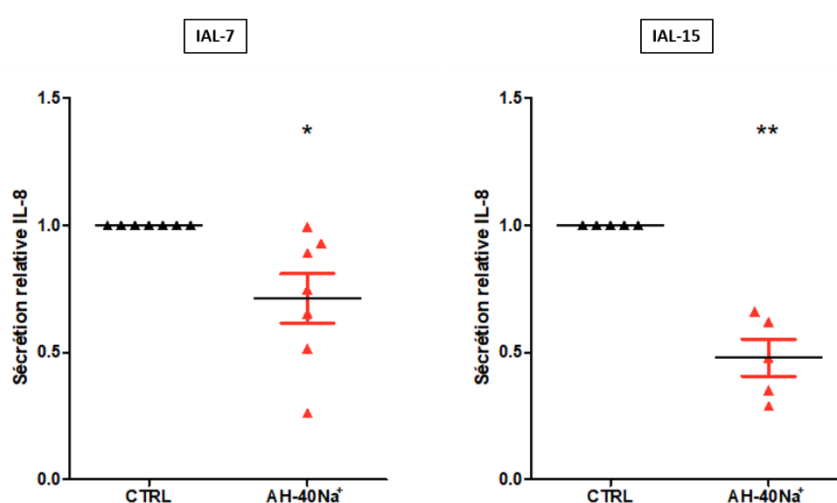


Figure 39: sécrétion de l'IL-8 par les cellules primaires bronchiques CF cultivées en IAL en cas de traitement par l'AH-Na⁺ de 40 kDa dans la chambre basale.

Les cellules primaires bronchiques CF cultivées en IAL ont été traitées par l'AH-Na⁺ de 40 kDa pendant 7 à 15 jours dans la chambre basale. La technique ELISA a été utilisée pour détecter et quantifier la sécrétion d'IL-8 dans les milieux basaux des cellules CF (n = 5 à 7). CTRL : milieu contrôle. IAL : interface air-liquide.

3.2. Analyse de l'expression d'un panel de chimiokines et de cytokines par les cellules primaires bronchiques CF cultivées en IAL et traitées par l'AH-Na⁺ de 40 kDa

Pour analyser l'influence de l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur les sécrétions basales globales des cellules CF, nous avons réalisé un *Proteome Profiler Human Cytokine Array* (R&D System ®) sur des temps précoces de la différenciation de l'épithélium bronchique (**Figure 40 A ►**). Les cellules primaires bronchiques humaines CF ont été cultivées en IAL pendant 7 jours en présence ou non d'AH-Na⁺ (1 mg/mL) et les milieux basaux ont été récupérés et analysés (IAL-7, n = 3). Les sécrétions en chimiokines / cytokines sont représentées sous forme de Dot plot

(log2) (**Figure 40 B ▼**). Nos résultats montrent que le traitement basal, pendant 7 jours, des cellules CF en cours de différenciation, par l'AH-Na⁺ de 40 kDa permet d'observer trois cytokines majoritairement sécrétées par les cellules CF : IL-8, MIF et CXCL1/GRO α , avec un log2 compris entre 5 et 7,5. Parmi ces trois cytokines, une diminution de la sécrétion de l'IL-8 et de MIF a été observée avec des ratios AH-Na⁺ / CTRL de 0,41 et 0,53, respectivement. En revanche, l'AH-Na⁺ de 40 kDa augmente la sécrétion de l'IL-12p70 et de l'IL-18 avec des ratios AH-Na⁺ / CTRL de 1,98 et 1,12, respectivement.

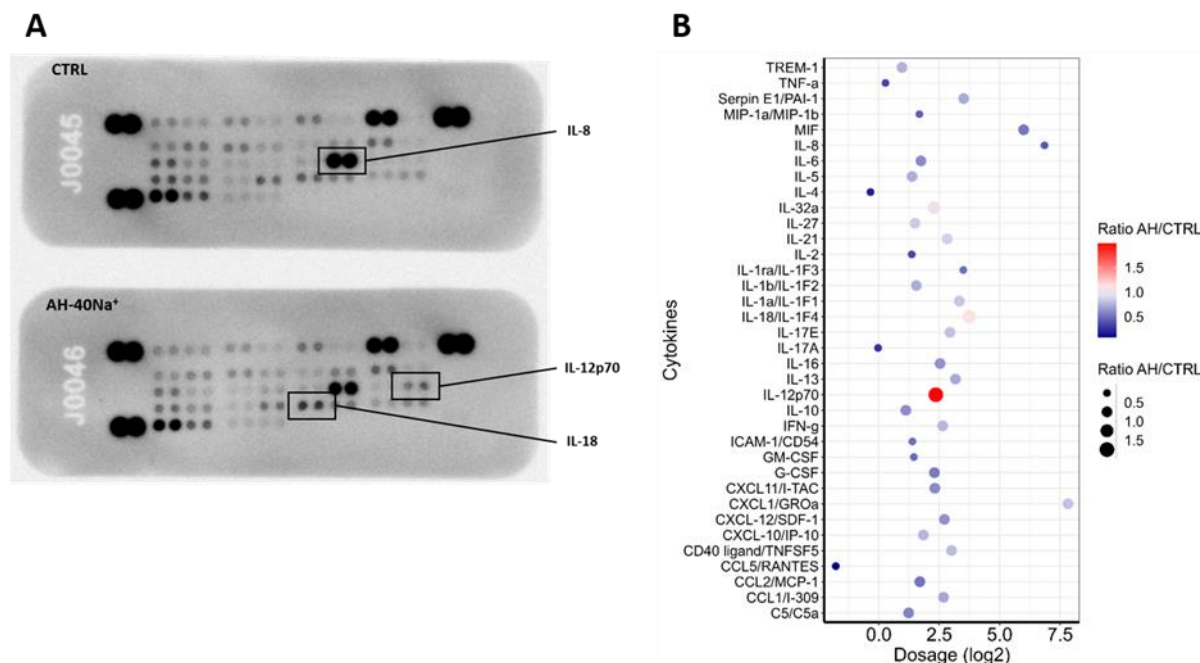


Figure 40: sécrétion de chimiokines et de cytokines par les cellules primaires bronchiques CF cultivées en IAL.

Les cellules primaires bronchiques CF cultivées en IAL ont été traitées pendant 7 jours consécutifs par l'AH-Na⁺ de 40 kDa dans le compartiment basal. Les milieux basaux ont été récoltés, puis l'expression des chimiokines et cytokines sécrétées a été analysées par *Proteome Profiler Human Cytokine Array* (A). Les couleurs de la carte thermique correspondent aux ratios de cytokines et de chimiokines AH-Na⁺ / CTRL dans les milieux basaux prélevés à IAL-J7. Les protéines régulées à la baisse sont représentées en bleu alors que les protéines régulées à la hausse sont représentées en rouge (B).

4. Etude des mécanismes d'action de l'AH-Na⁺ de 40 kDa

L'AH de bas poids moléculaire est décrit dans la littérature comme présentant une action plutôt pro-inflammatoire. De façon surprenante donc, nos résultats montrent que l'AH-Na⁺ de 40 kDa présente une action anti-inflammatoire vis-à-vis des cellules de l'épithélium bronchique humain CF mais aussi non-CF, et ce principalement dans un contexte inflammatoire. Dans la littérature, les études rapportant l'effet pro-inflammatoire des AH de bas poids moléculaire

utilisent des concentrations en AH de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$. Nous avons émis l'hypothèse d'une influence potentielle de la concentration en AH de bas poids moléculaire sur son effet vis-à-vis de l'inflammation. Nous avons donc tenté de déterminer les mécanismes d'action de l' AH-Na^+ en utilisant des doses croissantes (0,01 ; 0,1 ; 1 et 2 mg/mL) sur des cellules épithéliales primaires bronchiques humaines non-CF cultivées en monocouches.

4.1. Influence dose-dépendante de l' AH-Na^+ de 40 kDa sur l'inflammation des cellules non-CF

Pour définir le mode d'action de l' AH-Na^+ de 40 kDa sur la sécrétion d'IL-8, les cellules primaires bronchiques humaines non-CF ($n= 5$) ont été traitées avec différente concentration (0,01 ; 0,1 ; 1 et 2 mg/mL) d' AH-Na^+ de 40 kDa, en présence ou non de Cytomix (**Figure 41** ▼). Nous avons analysé la quantité d'IL-8 sécrétée par ELISA après 24 heures de traitement.

Nos résultats montrent que quelle que soit la concentration en AH-Na^+ de 40 kDa, la sécrétion d'IL-8 ne varie pas, en comparaison de la condition contrôle, lorsque les cellules primaires bronchiques sont traitées avec l' AH-Na^+ seul. Cependant, en condition d'inflammation, les résultats semblent d'un autre ordre. En effet, nos résultats montrent que bien que l' AH-40Na^+ n'ait aucun effet sur la sécrétion d'IL-8 lorsque les cellules sont traitées par des concentrations de 1 mg/mL ($p= 0,4315$) et 2 mg/mL ($p= 0,1027$) supplémenté en Cytomix, la sécrétion d'IL-8 augmente rapidement, bien que de manière non significative (0,01 mg/mL : $p= 0,0748$; 0,1 mg/mL : $p= 0,1875$) lorsque les cellules sont traitées avec des doses plus faibles en AH-Na^+ de 40 kDa, de l'ordre de 0,01 mg/mL ($p= 0,748$) et 0,1 mg/mL ($p= 0,1875$). L'effet de l' AH-Na^+ de 40 kDa semble donc être dose-dépendant.

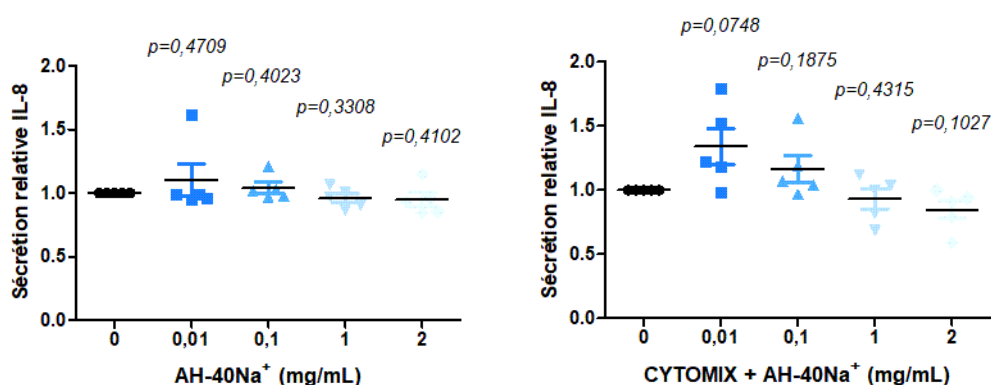


Figure 41: sécrétion d'IL-8 par les cellules primaires bronchiques humaines non-CF sous l'effet de concentration croissante d' AH-Na^+ de 40 kDa.

Les cellules primaires bronchiques non-CF ont été traitées pendant 24 heures avec l' AH-Na^+ de 40 kDa supplémenté ou non par le cocktail Cytomix. La technique ELISA a été utilisée pour détecter et quantifier la sécrétion d'IL-8 dans les surnageants cellulaires.

4.2. Influence dose-dépendante de l’AH-Na⁺ de 40 kDa sur l’activation de la voie NF-κB dans les cellules primaires bronchiques humaines non-CF

Afin d’analyser l’activation éventuelle de la voie NF-κB/IκB-α, nous avons traité des cellules primaires bronchiques humaines non-CF cultivées en monocouche (n= 5) avec des doses croissantes d’AH-Na⁺ de 40 kDa seul (0,01 ; 0,1 ; 1 et 2 mg/mL) (**Figure 42 ▼**). L’expression des formes non phosphorylée et phosphorylée de NF-κB et IκB-α a été analysée par western-blotting (**Figure 42 A ▼**). Nous nous sommes intéressés à l’inhibiteur de NF-κB, IκB-α, et à sa forme phosphorylée sur la sérine 36 (S36), ainsi qu’à la forme totale de NF-κB et à sa forme phosphorylée sur la 536 de de la sous-unité p65. Les résultats indiquent qu’à 0,01 et 0,1 mg/mL, l’AH-Na⁺ de 40 kDa n’a aucun effet sur la phosphorylation de IκB-α et de NF-κB, en comparaison à la condition Contrôle. A ces concentrations, l’AH-Na⁺ de 40 kDa ne semble pas avoir d’impact sur l’état d’activation de la voie NF-κB. En revanche, à une concentration de 1 et 2 mg / mL, l’AH-Na⁺ de 40 kDa entraîne la phosphorylation d’IκB-α, avec une augmentation significative du ratio pIκB-α/IκB-α total à 1 mg/mL ($p \leq 0,05$) et à 2 mg/mL ($p \leq 0,01$). Cependant, aucune variation d’activation/inhibition n’est observée pour la sous-unité p65 du facteur de transcription NF-κB (**Figure 42 B ▼**).

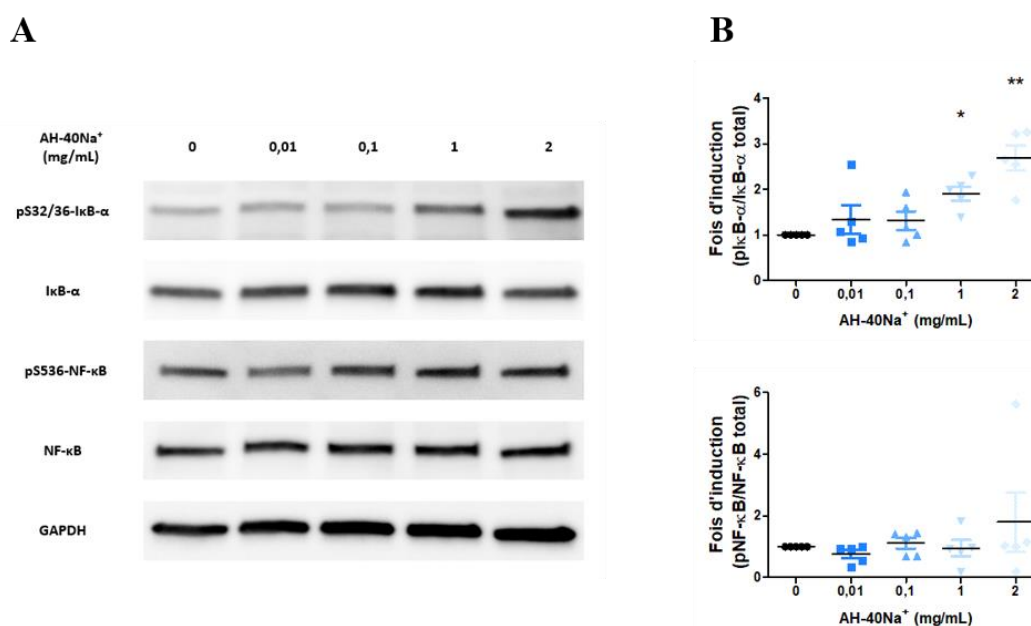
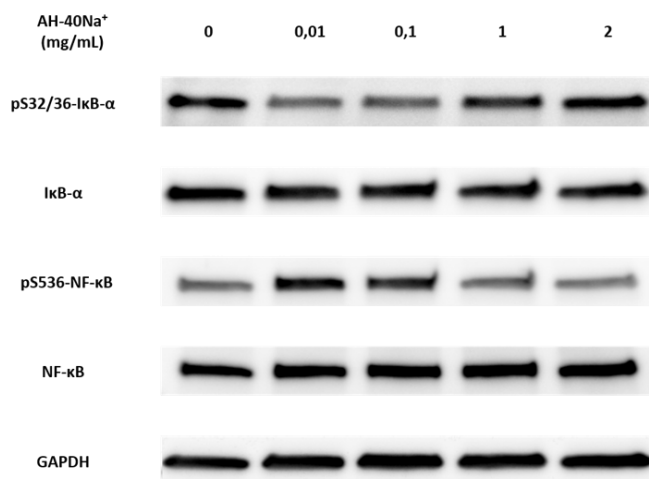


Figure 42: analyse par western blotting de la voie NF-κB dans les cultures de cellules primaires bronchiques non-CF traitées avec des doses croissantes d’AH-Na⁺ de 40 kDa en absence de contexte inflammatoire.

Les cellules primaires bronchiques non-CF ont été traitées pendant 24 heures par l’AH-Na⁺ de 40 kDa à différentes concentrations. Les protéines ont été extraites et séparées par électrophorèse selon un gradient 4-20 %. La détection des protéines d’intérêt est représentée dans la figure A. L’intégration des bandes détectées a été rapportée à la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogenase (GAPDH). Les fois d’induction ont été calculés selon le rapport forme phosphorylée / forme totale (B).

De la même manière, nous avons traité des cellules primaires bronchiques humaines non-CF cultivées en monocouche (n= 5) avec des doses croissantes d'AH-Na⁺ de 40 kDa (0,01 ; 0,1 ; 1 et 2 mg/mL) en présence de Cytomix (**Figure 43 ▼**). L'expression des formes non phosphorylée et phosphorylée de NF-κB et IκBα a également été analysée par western-blotting dans ces conditions de culture (**Figure 43 A ▼**). De façon surprenante, aucune variation significative du ratio pIκB-α/IκB-α n'est observé, quelle que soit la concentration en AH-Na⁺ de 40 kDa en condition inflammatoire. En revanche, nous pouvons observer une légère diminution, non significative, du ratio pNF-κB/NF-κB total aux concentrations de 1 et de 2 mg/mL, liée à la diminution de la phosphorylation de la sous-unité p65 de NF-κB. (**Figure 43 B ▼**).

A



B

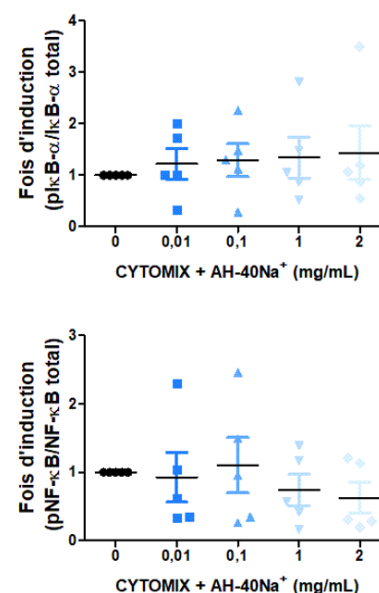


Figure 43 : analyse par western blotting de la voie NF-κB dans les cultures de cellules primaires bronchiques non-CF traitées avec des doses croissantes d'AH-Na⁺ de 40 kDa en présence d'un contexte inflammatoire (Cytomix).

Les cellules primaires bronchiques non-CF ont été traitées pendant 24 heures par l'AH-Na⁺ de 40 kDa à différentes concentrations et en présence de Cytomix. Les protéines ont été extraites et séparées par électrophorèse selon un gradient 4-20 %. La détection des protéines d'intérêt est représentée dans la figure A. L'intégration des bandes détectées a été rapportée à la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Les fois d'induction ont été calculés selon le rapport forme

4.3. Influence dose-dépendante de l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur l'expression et la localisation des hyaladhérines TLR-4 et CD44

Nous avons mis en évidence un effet anti-inflammatoire de l'AH-Na⁺ de 40 kDa, uniquement dans des conditions d'inflammation générée par le Cytomix. Cet effet ne semble pas se retrouver lorsque les cellules non-CF sont traitées avec l'AH-Na⁺ de 40 kDa seul. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à l'expression et la localisation de deux hyaladhérines possédant une forte affinité pour l'AH, CD44 et TLR-4, afin de caractériser l'organisation différentielle potentielle de ces récepteurs à la membrane plasmique cellulaire qui pourrait expliquer les résultats obtenus. Pour ce faire, nous avons cultivé des cellules primaires bronchiques humaines non-CF en monocouche sur lamelle de verre. A confluence, les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec l'AH-Na⁺ de 40 kDa à des concentrations croissantes de 0,01, 1 et 2 mg/mL, en présence ou non de Cytomix (**Figure 44 ►**).

L'immunodétection de TLR-4 et de CD44 montre une expression de ces deux hyaladhérines par les cellules primaires bronchiques humaines non-CF. En absence de tout traitement (Contrôle), on observe la présence de CD44 au niveau de la membrane plasmique des cellules bronchiques non-CF et une absence de cluster de TLR-4 à la membrane. TLR-4 semble plutôt présent au niveau cytoplasmique. En revanche, lorsque les cellules sont traitées avec des concentrations d'AH-Na⁺ de 40 kDa de 0,01 et 1 mg/mL, CD44 reste localisé au niveau membranaire mais nous pouvons également mettre en évidence des clusters membranaires de TLR-4 (flèches blanches). Ces observations de TLR-4 membranaire ne sont plus visibles lorsque les cellules sont traitées avec 2 mg/mL d'AH-Na⁺ de 40 kDa. De la même manière, aucun cluster membranaire de TLR-4 n'est observé lorsque les cellules épithéliales bronchiques non-CF sont traitées avec l'AH-Na⁺ de 40 kDa, quelle que soit la concentration, en présence de Cytomix.

Nous nous sommes enfin intéressés à l'expression des différents isoformes de CD44 par les cellules primaires bronchiques non-CF, en présence ou absence de traitement par l'AH-Na⁺ de 40 kDa (1 mg/mL) supplémenté au non en Cytomix (**Figure 45 ►**). Pour cela, nous avons traité des cellules primaires bronchiques humaines non-CF cultivées en monocouche (n= 5) avec 1 mg/mL d'AH-Na⁺ de 40 kDa en présence ou non de Cytomix. Les ARN totaux des cellules ont été extrait et l'expression des isoformes de CD44 a été analysée en RT-qPCR. En condition de culture contrôle, la répartition croissante de l'expression des différentes isoformes de CD44 se fait de la manière suivante : CD44 standard (0,61 % ± 0,68) < CD44v2v10 (3,96% ± 1,48) < CD44v8v10 (7,97 % ± 5,03) < CD44v3v10 (13,53 % ± 2,46) CD44 non définis

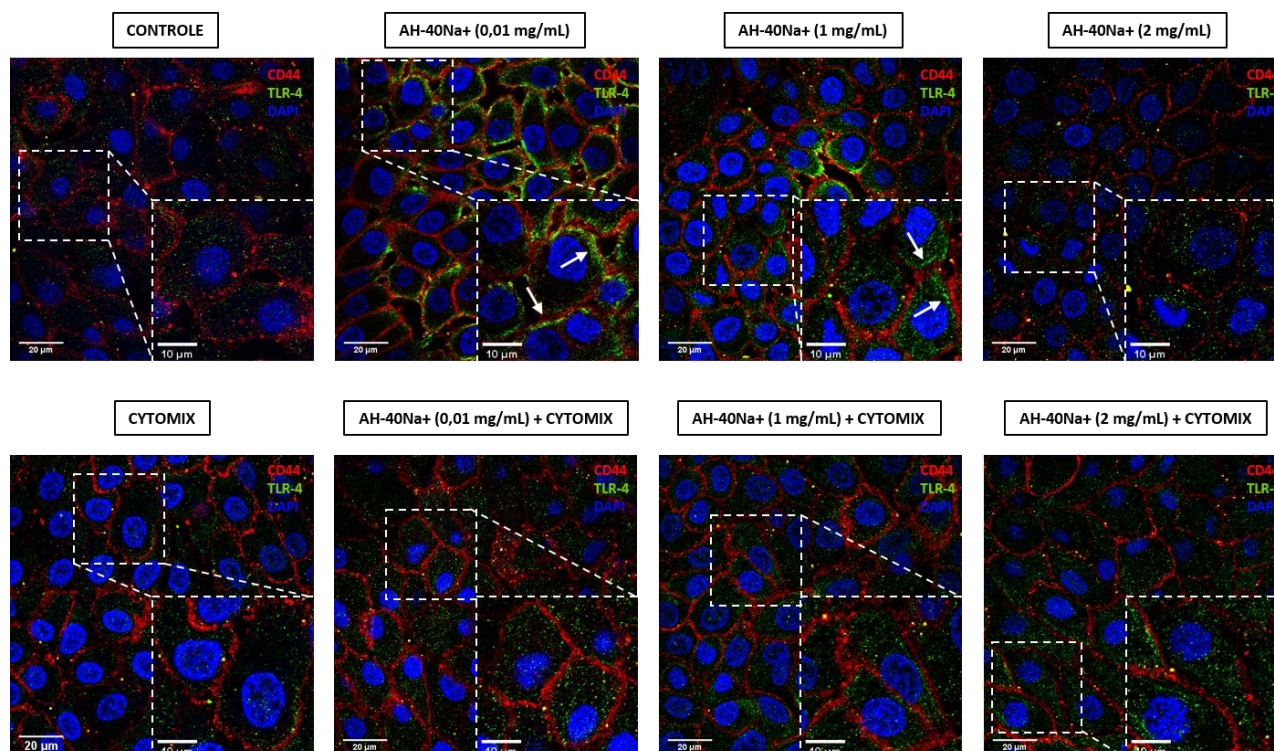


Figure 44: analyse immunocytochimique de l'expression de TLR-4 et CD44 par les cellules primaires bronchiques non-CF.

Les cellules primaires bronchiques non-CF ont été cultivées en monocouche. A confluence, les cellules ont été traitées ou non pendant 24 heures par l'AH-40Na⁺ à différentes concentrations (0,01, 1 et 2 mg/mL) en présence ou non de Cytomix. L'analyse de l'expression et de la localisation des récepteurs TLR-4 (en vert) et CD44 (en rouge) a été réalisée en immunocytochimie. Les noyaux (en bleu) ont été mis en évidence par le DAPI. Les préparations ont été observées au grossissement x63, en microscopie confocale. L'analyse d'image a été réalisée par l'utilisation du logiciel ImageJ.

(19,87 % ± 9,77) < CD44v6 (54,07 % ± 5,36). Lorsque les cellules non-CF sont traitées par l'AH-Na⁺ de 40 kDa, la répartition croissante des profils d'expression des isoformes n'est pas modifiée : CD44 standard (1,43 % ± 1,95) < CD44v2v10 (6,44 % ± 1,56) < CD44v8v10 (7,72 % ± 5,34) < CD44v3v10 (13,4 % ± 2,3) < CD44 non définis (10,48 % ± 26,04) < CD44v6 (60,54 % ± 20,84). Lorsque les cellules non-CF sont traitées avec le Cytomix, l'expression de CD44 standard (1,77 % ± 1,56), CD44v2v10 (2,49 % ± 0,55), CD44v3v10 (13,38 % ± 2,27) et CD44v6 (53,1 % ± 8,05) respecte la répartition observée pour la condition Contrôle. En revanche, on observe une diminution de la proportion de formes CD44 non définies (9,59 % ± 14,17 contre 19,87 % ± 9,77 pour la condition Contrôle) alors que l'expression de CD44v8v10 augmente (19,66 % ± 12,68 contre 7,97 % ± 5,03 pour la condition Contrôle). Ces résultats sont également observés lorsque les cellules non-CF sont traitées avec 1 mg/mL d'AH-Na⁺ de 40

kDa supplémenté en Cytomix. Une diminution de la proportion des formes CD44 non définies (2,93 % ± 33,51 contre 10,48 % ± 26,04 pour la condition Contrôle) est observée alors que l'expression de CD44v8v10 augmente (20,88 % ± 17,67 contre 7,72 % ± 5,34 pour la condition Contrôle). En conclusion de l'ensemble de ces résultats, il n'y a aucun effet de l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur l'expression des isoformes de CD44 par les cellules primaires bronchiques humaines non-CF. Cependant, l'isoforme CD44v8v10 semble être surexprimée lorsque les cellules sont en condition inflammatoire par traitement par le Cytomix, que ce soit en présence ou en absence d'AH-Na⁺.

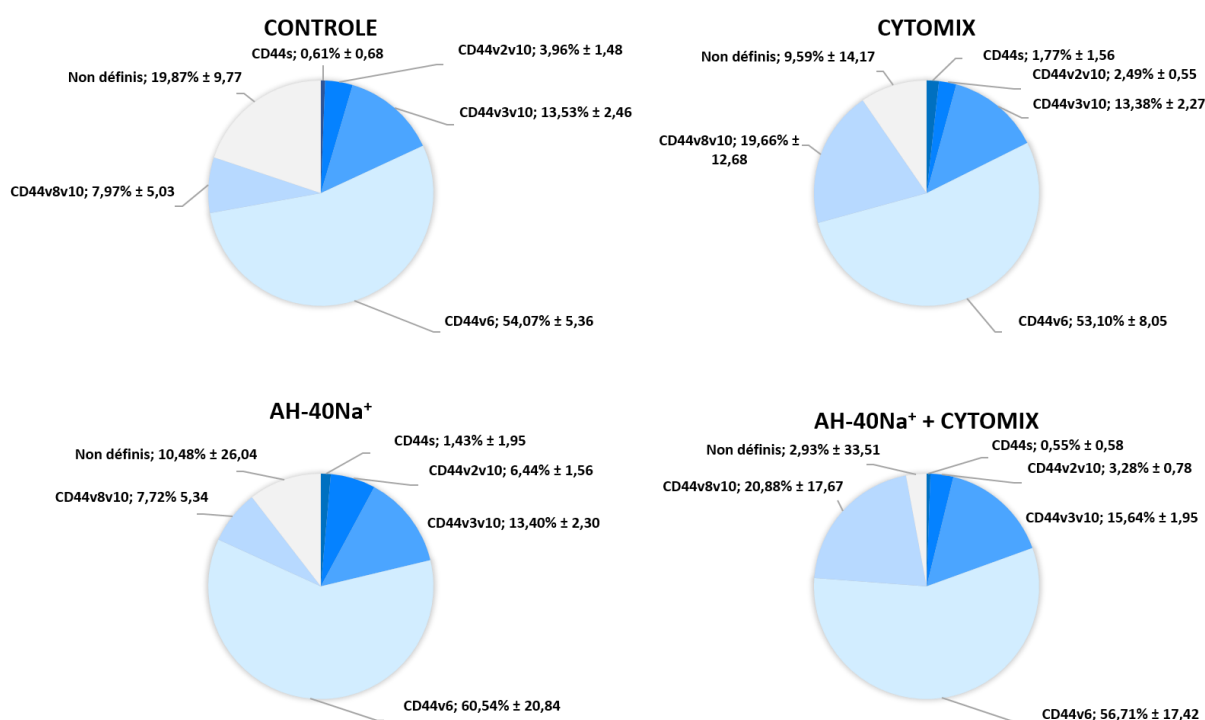


Figure 45: effets de l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur expression des différentes isoformes de CD44 par les cellules primaires bronchiques humaines non-CF.

Les cellules primaires bronchiques non-CF ont été cultivées monocouche. A confluence, elles ont été traitées ou non pendant 24 heures avec 1 mg/mL d'AH-Na⁺ de 40 kDa, en présence ou en absence de Cytomix. Après extractions des ARNs, nous avons analysé le profil d'expression des isoformes de CD44 par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en pourcentage selon le ratio isoformes CD44 /forme totale CD44.

SYNTHESE, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

SYNTHÈSE, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Synthèse et discussion

La CF est une maladie génétique rare à transmission autosomique récessive, due à des mutations du gène *CFTR* codant le canal chlore CFTR. Elle affecte différents organes sécréteurs notamment le tissu pulmonaire, générant une déshydratation, un épaissement et une accumulation de mucus qui ensemble, entraînent une altération de la clairance mucociliaire. La modification du mucus favorise des infections qui deviennent chroniques dans les voies aériennes et s'accompagnent d'une inflammation pulmonaire importante.

En effet, dans les travaux précédents réalisés au sein du laboratoire, il a été également démontré que sur des cultures non-CF remodelées suite à une inflammation chronique, un traitement avec l'AH-Na⁺ de 40 kDa restaurait un épithélium non remodelé. Dans la mesure où le remodelage observé, tant dans les cultures CF que non-CF, est lié à l'inflammation et que l'AH-Na⁺ de 40 kDa régule ce remodelage, il nous est apparu important de nous intéresser à l'influence de l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur l'inflammation des cellules épithéliales bronchique humaines, CF et non-CF. Le but de ce projet est de déterminer son utilisation potentielle en tant qu'anti-inflammatoire dans cette pathologie ainsi que dans les pathologies respiratoires inflammatoires chroniques.

Cette thèse a été organisée selon trois objectifs : le premier a été d'étudier l'effet de l'AH-Na⁺ de 40 kDa, en condition contrôle ou en contexte inflammatoire, sur la sécrétion d'IL-8 par les différentes cellules épithéliales cultivées en monocouche. Le second objectif a consisté à définir l'effet anti-inflammatoire préventif et/ou curatif potentiel de l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur les cellules bronchiques en culture en monocouche mais également sur les cellules épithéliales bronchiques primaires, en culture en interface air-liquide. Enfin, pour le dernier objectif, nous nous sommes intéressés aux mécanismes mis en jeu lors de ce processus, en ciblant spécifiquement les récepteurs CD44 et TLR-4, et la voie de signalisation NF-κB.

Notre étude a débuté par la mise au point d'un modèle expérimental pour l'étude de l'inflammation cellulaire en réponse au cocktail de cytokines pro-inflammatoires Cytomix en utilisant des lignées cellulaires. Après analyse de la sécrétion d'IL-8, les lignées non-CF NuLi-1 et CF CuFi-1 ont montré une stimulation plus importante au Cytomix que les lignées CFBE-WT et -F508del. Pour vérifier leur réponse aux traitements préventif et curatif, les cellules NuLi-1 et CuFi-1 ont été soumises à une double stimulation de 24 heures par le Cytomix. Les données indiquent que les cellules CF sont plus stimulables que les cellules non-CF. Nous avons ensuite réalisé une cinétique de réponse à un stimulus inflammatoire en présence ou non d'AH-

Na⁺ de 40 kDa qui a permis de mettre en évidence une tendance anti-inflammatoire de l'AH-Na⁺ de 40 kDa au temps 24 heures. Enfin, nous nous sommes intéressés aux propriétés anti-inflammatoires préventives et curatives potentielles de l'AH-Na⁺ de 40 kDa en comparaison à la dexaméthasone. Dans le cas de l'étude du potentiel anti-inflammatoire préventif de l'AH-Na⁺ de 40 kDa, le prétraitement des cellules NuLi-1 et CuFi-1 par l'AH-Na⁺ sans stimulus inflammation exogène met en évidence un effet pro-inflammatoire avec une augmentation de la sécrétion d'IL-8, alors que la dexaméthasone diminue cette sécrétion. En revanche, nous avons observé une diminution non significative de la sécrétion d'IL-8 lorsque les cellules sont soumises au co-traitement AH-Na⁺ et Cytomix consécutivement à un prétraitement par l'AH-Na⁺ de 40 kDa. Lorsque l'on s'intéresse à l'effet anti-inflammatoire curatif potentiel de l'AH-Na⁺ de 40 kDa, on peut observer que le traitement curatif des cellules NuLi-1 et CuFi-1 par l'AH-Na⁺ sans inflammation exogène entraîne une sécrétion accrue d'IL-8, signe d'un effet pro-inflammatoire, alors que la dexaméthasone diminue significativement cette sécrétion. En revanche, une diminution non significative de la sécrétion d'IL-8 lorsque les cellules sont soumises au co-traitement AH-Na⁺ et Cytomix suite à un prétraitement par le Cytomix a été observée.

Pour appuyer les résultats obtenus, nous avons testé l'influence de l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur des cellules épithéliales primaires bronchiques CF et non-CF non différenciées cultivées en monocouche. Contrairement à ce qui a été observé avec les lignées cellulaires, le traitement par l'AH-Na⁺ seul n'a aucun effet sur la sécrétion d'IL-8 par les cellules primaires bronchiques CF et non-CF. En revanche, dans un contexte préalablement enflammé, le traitement des cellules CF et non-CF par l'AH-Na⁺ additionné de Cytomix permet de mettre en évidence un effet anti-inflammatoire de l'AH de 40 kDa objectivé par une diminution de la sécrétion d'IL-8 par ces cellules. Cet effet est comparable à l'effet observé lorsque les cellules sont co-traitées par la dexaméthasone et le Cytomix dans un contexte enflammé. Les résultats obtenus confirment également que l'AH-Na⁺ de 40 kDa n'a aucun effet anti-inflammatoire préventif puisque le prétraitement des cellules primaires par l'AH-Na⁺ n'exerce aucun effet sur la sécrétion d'IL-8 en condition contrôle ou enflammée par les cellules épithéliales bronchiques humaines CF et non-CF. Enfin, lorsque l'on étudie le traitement curatif par l'AH-Na⁺ de 40 kDa, on peut conclure que la diminution significative de la sécrétion en IL-8 en présence d'un contexte inflammatoire démontrent une action anti-inflammatoire curative de l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur les cellules épithéliales bronchiques CF et non-CF.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus montrent que l'AH-Na⁺ de 40 kDa possède des effets divergents en fonction de la présence ou non d'une inflammation exogène

générée par le Cytomix. Aucun effet anti-inflammatoire n'est observé en absence de Cytomix. Une action pro-inflammatoire peut même être détectée sur les cellules de la lignée NuLi-1. En revanche, en présence d'un contexte enflammé, l'AH-Na⁺ de 40 kDa possède un effet anti-inflammatoire évident. Ces résultats sont surprenants car la littérature référence les AH de bas poids moléculaire comme des effecteurs pro-inflammatoires pour les cellules épithéliales bronchiques (Boodoo *et al.*, 2006; Ochoa *et al.*, 2011) en ciblant notamment l'activation de la voie NF-κB. Les AH de bas poids moléculaires sont particulièrement décrits comme des agonistes des récepteurs TLR-2 et TLR-4 considérés comme des molécules de danger (Powell and Horton, 2005) (DAMP). De cette manière, ils assurent une réponse pro-inflammatoire en augmentant la migration des cellules immunitaires, leur prolifération et la production de cytokines pro-inflammatoires (Horton *et al.*, 1998; McKee *et al.*, 1996). Il est également surprenant de constater que l'effet anti-inflammatoire de l'AH-Na⁺ de 40 kDa que nous avons observé est comparable à l'effet anti-inflammatoire obtenu par un traitement avec la dexaméthasone.

Nous avons également utilisé un modèle de culture des cellules épithéliales bronchiques humaines en IAL pour tester l'efficacité du traitement par l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur des cellules primaires CF polarisées et en cours de différenciation. Nos résultats indiquent que le traitement prolongé de ces cellules avec l'AH-Na⁺ seul pendant 7 à 15 jours entraîne une diminution significative de la sécrétion polarisée d'IL-8 par ces cellules vers la chambre basale. Ces résultats sont intéressants puisque cet effet n'a pas été observé sur les cellules primaires bronchiques CF en monocouche, ce qui laisse supposer que la polarisation des cellules épithéliales bronchiques CF peut améliorer l'efficacité du traitement par l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur la sécrétion basale d'IL-8, que le traitement des cellules par leur pôle basal permet une meilleure efficacité qu'un traitement par le pôle apical même en absence de contexte enflammé, et que le modèle de culture en IAL, plus proche de la réalité bronchique que des lignées cellulaires, pourrait mimer l'effet anti-inflammatoire de l'AH-Na⁺ de 40 kDa que nous pourrions observer au niveau pulmonaire chez les patients. Ces résultats permettent de mettre en évidence un nouveau rôle des AH de bas poids moléculaires sur la sécrétion basale en IL-8 des cellules épithéliales bronchiques CF. Étrangement, la littérature indique que les AH de bas poids moléculaire participent, par exemple à l'activation des macrophages pulmonaires en maintenant leur activités pro-inflammatoires (Sokolowska *et al.*, 2014; Yamawaki *et al.*, 2009). Ces mêmes AH participeraient également à la maturation des cellules dendritiques par l'augmentation de l'IL-1β, du TNF-α et de l'IL-12 (Termeer *et al.*, 2000). Malgré tout, au travers de nos résultats, l'AH-Na⁺ de 40 kDa semble avoir un effet intéressant pour contrer la

migration et l'accumulation des neutrophiles prépondérants dans les bronches des patients CF (Kharazmi *et al.*, 1986).

Pour aller plus loin sur l'effet de l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur les sécrétions cytokiniques/chimiokines basales globales des cellules épithéliales bronchiques humaines CF, l'analyse de l'expression d'un panel de chimiokines et de cytokines par les cellules primaires bronchiques CF au stade IAL-7 nous a permis de confirmer que la sécrétion en IL-8 était diminuée, de même que celle de MIF. Cependant, nos résultats montrent que l'IL-12p70 et l'IL-18 sont augmentées dans les surnageants basaux des cellules épithéliales bronchiques CF lors d'un traitement chronique par l'AH-Na⁺ de 40 kDa. L'interleukine-12 (IL-12) est une cytokine hétérodimérique pro-inflammatoire impliquée dans la différenciation des cellules T naïves en cellules Th1 ainsi que dans la stimulation des activités cytotoxiques des cellules NK et des cellules T CD8⁺. Il a déjà été démontré que les AH de bas poids moléculaire induisaient la production d'IL-12 biologiquement active dont la production était inhibée par l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CD44 (Hodge-Dufour *et al.*, 1997). L'IL-18, quant à elle, est considérée également comme une cytokine pro-inflammatoire entraînant l'induction des réponses de type Th1 et participe donc à l'immunité innée et acquise (Dinarello, 1999). Même si nos résultats demandent à être confirmés sur une plus grande population de milieux de cultures de cellules épithéliales bronchiques de patients CF, ils sont malgré tout intéressants puisque l'IL-18 et l'IL-12 agissent en synergie pour stimuler les cellules Th1 et les cellules Natural Killer à produire de l'IFN-gamma nécessaire à l'immunité médiée par les cellules (Tominaga *et al.*, 2000). De cette manière, on peut penser que l'AH-Na⁺ de 40 kDa renforcerait l'immunité innée à travers les cellules NK et les cellules Th1, puis orienterait la réponse inflammatoire vers l'activation des macrophages M1, des macrophages inflammatoires et microbiocides (Mege and Capo, 2010).

Nous avons par la suite testé l'hypothèse d'un rôle anti-inflammatoire de l'AH-Na⁺ de 40 kDa dose-dépendant. Nos résultats semblent indiquer un effet dose-dépendant, avec une réponse pro-inflammatoire lorsque les cellules sont traitées par des doses de l'ordre du µg/mL (Boodoo *et al.*, 2006). Nous avons donc émis l'hypothèse d'un effet dose de l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur l'activation de la voie NF-κB/IκB-α dans les cellules épithéliales bronchiques en présence ou en absence d'inflammation exogène générée par le Cytomix. En condition sans inflammation, IκB-α est phosphorylé pour les doses les plus fortes d'AH-Na⁺ de 40 kDa mais il n'y a pas de variation de phosphorylation de NF-κB, en comparaison à la condition contrôle sans traitement par l'AH-Na⁺ de 40 kDa. De la même manière, l'AH-Na⁺ supplémenté en Cytomix ne montre aucune variation de phosphorylation d'IκB-α, quelle que soit la dose d'AH-

Na⁺ de 40 kDa, avec toutefois une légère diminution non significative du ratio pNF- κ B/pI κ B- α pour les doses de 1 et 2 mg/mL. Ces résultats semblent également montrer que dans un contexte inflammé, l'AH-Na⁺ de 40 kDa semble diminuer l'activation de la voie NF- κ B/I κ B- α contrairement à l'AH-Na⁺ seul. Nous nous sommes alors intéressés à l'expression et la localisation des hyaladhérines TLR-4 et CD44 en fonction de la dose de AH-Na⁺ de 40 kDa. Pour les conditions non supplémentées en Cytomix, lorsque les cellules sont traitées avec des faibles doses d'AH-Na⁺ (0,01 et 0,1 mg/mL), nous avons observé la présence de cluster de TLR-4 à la membrane, alors que pour toutes les autres concentrations, même en présence de Cytomix, les TLR-4 restent cytoplasmiques. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'expression des variants de CD44. Nos résultats indiquent que l'isoforme CD44v8v10 semble être surexprimée lorsque les cellules sont en condition inflammatoire générée par le Cytomix, que ce soit en présence ou en absence d'AH-Na⁺.

L'ensemble des résultats obtenus suggère que l'AH-Na⁺ de 40 kDa présente un effet double en fonction de l'environnement, inflammatoire ou non, dans lequel se trouvent les cellules épithéliales bronchiques. Il semblerait qu'en contexte inflammatoire, l'AH de bas poids moléculaire possède des propriétés anti-inflammatoires. En effet, dans ces conditions, il a été démontré que d'autres protéines se retrouvent surexprimées, parmi lesquelles se trouve TSG-6 (Lee *et al.*, 2009). La capacité de TSG-6 à moduler l'interaction de l'AH avec le CD44 a des implications importantes pour l'activité cellulaire médiée par le CD44 dans les sites d'inflammation (Lesley *et al.*, 2004). Selon cette hypothèse, les AH de bas poids moléculaire, sous forme réticulés, pourraient interagir avec le récepteur CD44, qui dans notre étude pourrait être majoritairement le récepteur CD44v8v10, et induire une signalisation anti-inflammatoire. Cette inhibition pourrait également impliquer IRAK-M et son effet inhibiteur sur la voie NF- κ B/I κ B- α induite par TLR-4.

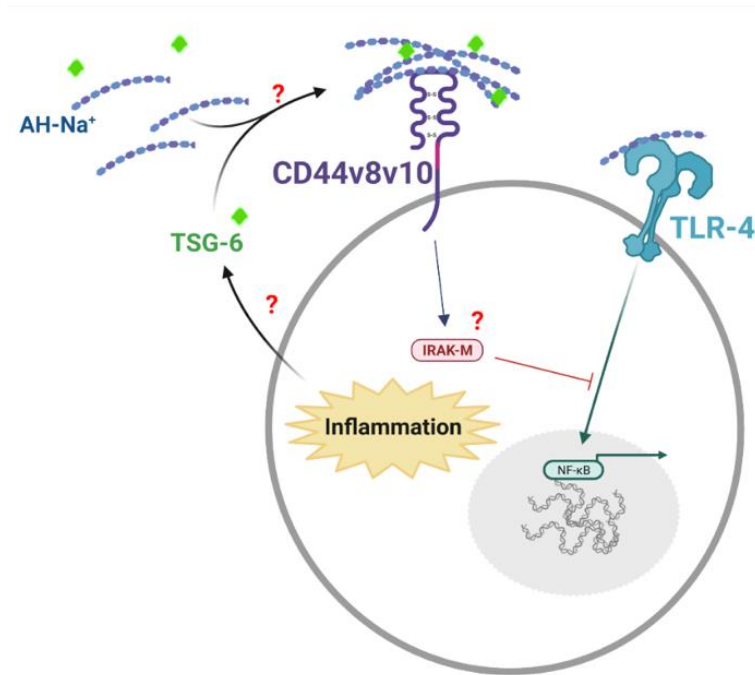


Figure 46: hypothèses associées aux rôles de l'AH de bas poids moléculaire dans un contexte inflammatoire

2. Perspectives

A court terme, il serait intéressant de vérifier au temps IAL-7 et IAL-15, le niveau de sécrétion en IL-8 lorsque les cellules CF sont traitées par le cocktail de cytokines pro-inflammatoires Cytomix versus AH-Na⁺ + Cytomix. En considérant les effets du traitement par l'AH-Na⁺ seul ainsi que les différentes observations faites lorsque les cellules épithéliales bronchiques CF sont soumises à un traitement par l'AH-Na⁺ en condition enflammée, on peut supposer que la sécrétion sera diminuée. Il serait également utile de refaire les expériences réalisées en culture en IAL au stade de différenciation finale des cellules bronchiques, à IAL-35, pour évaluer les effets de l'AH-Na⁺ de 40 kDa en condition inflammatoire sur un épithélium entièrement différencié. Afin de valider l'étude de l'effet anti-inflammatoire global de l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur les cellules primaires bronchiques CF grâce à utilisation de cytokine arrays, il faudra augmenter le nombre de cultures de patients CF différents pour avoir un rendu plus précis sur l'influence de l'AH-Na⁺ par rapport à la condition Contrôle. Ces mêmes analyses devront également être réalisées sur des cellules CF enflammées en co-traitement ou non avec l'AH-Na⁺ de 40 kDa. Nous devons également poursuivre l'étude des mécanismes d'action de l'AH-Na⁺ de 40 kDa. Pour cela, il faudrait étudier la voie de signalisation NF-κB dans un plus

grand nombre des cellules bronchiques de patients CF en condition Contrôle et enflammée. Il sera également intéressant d'étudier d'autres sites de phosphorylation à l'origine de la l'activation de la voie NF- κ B : lors de l'étude de l'influence dose-dépendante de l'AH-Na⁺ de 40 kDa, nous avons observé que I κ B- α était activé significativement de manière dose-dépendante par l'AH-Na⁺, sans observer de variation de phosphorylation de la sérine 536 de la sous-unité p65 de NF- κ B. Nous pourrions par exemple utiliser, dans un premier temps, un vecteur luciférase p65-NF- κ B pour vérifier que l'activité luciférase passe par cette sous-unité en cas de traitement par l'AH-Na⁺ sans discriminer la phosphorylation à l'origine de la translocation nucléaire de p65. Il se pourrait également que cette activation induite de la voie NF- κ B passe par la libération d'autres sous-unités de NF- κ B comme RelB ou c-Rel. Nous pouvons également nous orienter vers d'autres voies associées à l'inflammation comme la voie des MAP kinases.

Dans la poursuite de ce projet et pour comprendre l'influence qu'exerce l'AH-Na⁺ de 40 kDa sur la sécrétion d'IL-8 dans un contexte enflammé, il serait intéressant d'étudier l'expression de TSG-6, de IRAK-M et de TRAF6, que ce soit en condition contrôle comme en condition inflammatoires en présence du Cytomix. Afin de mettre en évidence que l'interaction AH-Na⁺/CD44 est à l'origine de la signalisation anti-inflammatoire, il faudrait étudier les interactions TSG-6/AH et AH/CD44, par immunoprécipitation par exemple. Il serait également intéressant de montrer des interactions proches éventuelles entre TSG-6 et CD44 par *Proximity Ligation Assay* (Alam, 2018). En fonction des résultats obtenus, il faudrait vérifier ces observations sur un modèle TSG-6^{-/-} invalidé par siRNA ou par la méthode CRISP-Cas9.

L'hypoxie s'accompagne fréquemment d'une inflammation pulmonaire. Il serait donc intéressant d'étudier l'influence de l'AH-Na⁺ de 40 kDa dans ces conditions d'hypoxie, en utilisant un modèle de cultures de cellules épithéliales bronchiques en 3D exposées à un environnement hypoxique (1,5 % d'O₂-5 % de CO₂-94,5 % de N₂) (Delbrel *et al.*, 2019) ou par l'utilisation de modèles murins exposés à 10 % d'O₂ (Hashimoto and Gupte, 2022).

Enfin, suite aux résultats obtenus sur les cellules épithéliales bronchiques CF, il serait intéressant de déterminer si l'AH-Na⁺ a une meilleure efficacité anti-inflammatoire que l'azithromycine par exemple, que ce soit sur un modèle *in vitro* ou *in vivo*. L'azithromycine est un traitement anti-inflammatoire au long cours dans la CF. Ce traitement est à discuter chez tous les patients CF à partir de l'âge de 6 ans, quel que soit leur statut bactériologique (en dehors des infections à mycobactéries atypiques) mais nécessite une surveillance mycologique (examen cyto-bactériologique des crachats, colonisation aspergillaire, aspergillose broncho-

pulmonaire allergique, +/- résistance) (Abely *et al.*, 2015). Une alternative pourrait donc s'avérer intéressante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abely, M., Jubin, V., Bessaci-Kabouya, K., Chiron, R., Bui, S., Fayon, M., 2015. [National consensus regarding azithromycin use in cystic fibrosis]. *Rev. Mal. Respir.* 32, 557–565. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2014.10.733>
- Adam, D., Perotin, J.-M., Lebargy, F., Birembaut, P., Deslée, G., Coraux, C., 2014. [Regeneration of airway epithelium]. *Rev. Mal. Respir.* 31, 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2013.11.001>
- Adam, D., Roux-Delrieu, J., Luczka, E., Bonnomet, A., Lesage, J., Mérol, J.-C., Polette, M., Abély, M., Coraux, C., 2015. Cystic fibrosis airway epithelium remodelling: involvement of inflammation. *J. Pathol.* 235, 408–419. <https://doi.org/10.1002/path.4471>
- Agnel, M., Verinat, T., Culouscou, J.M., 1999. Identification of three novel members of the calcium-dependent chloride channel (CaCC) family predominantly expressed in the digestive tract and trachea. *FEBS Lett.* 455, 295–301. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00891-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00891-1)
- Agre, P., 2006. The aquaporin water channels. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3, 5–13. <https://doi.org/10.1513/pats.200510-109JH>
- Alam, M.S., 2018. Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr. Protoc. Immunol.* 123, e58. <https://doi.org/10.1002/cpim.58>
- Anderson, M.P., Berger, H.A., Rich, D.P., Gregory, R.J., Smith, A.E., Welsh, M.J., 1991. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell* 67, 775–784. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90072-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90072-7)
- Anzalone, A.V., Randolph, P.B., Davis, J.R., Sousa, A.A., Koblan, L.W., Levy, J.M., Chen, P.J., Wilson, C., Newby, G.A., Raguram, A., Liu, D.R., 2019. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576, 149–157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Arbour, N.C., Lorenz, E., Schutte, B.C., Zabner, J., Kline, J.N., Jones, M., Frees, K., Watt, J.L., Schwartz, D.A., 2000. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat. Genet.* 25, 187–191. <https://doi.org/10.1038/76048>
- Armstrong, D.S., Hook, S.M., Jansen, K.M., Nixon, G.M., Carzino, R., Carlin, J.B., Robertson, C.F., Grimwood, K., 2005. Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Pediatr. Pulmonol.* 40, 500–510. <https://doi.org/10.1002/ppul.20294>
- Assmann, V., Jenkinson, D., Marshall, J.F., Hart, I.R., 1999. The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 22), 3943–3954. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.22.3943>
- Aumailley, M., Battaglia, C., Mayer, U., Reinhardt, D., Nischt, R., Timpl, R., Fox, J.W., 1993. Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components. *Kidney Int.* 43, 7–12. <https://doi.org/10.1038/ki.1993.3>

- Bals, R., Hiemstra, P.S., 2004. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur. Respir. J.* 23, 327–333. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00098803>
- Barasch, J., Kiss, B., Prince, A., Saiman, L., Gruenert, D., al-Awqati, Q., 1991. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* 352, 70–73. <https://doi.org/10.1038/352070a0>
- Bardou, O., Privé, A., Migneault, F., Roy-Camille, K., Dagenais, A., Berthiaume, Y., Brochiero, E., 2012. K⁺ channels regulate ENaC expression via changes in promoter activity and control fluid clearance in alveolar epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1682–1690. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.02.025>
- Bardou, O., Trinh, N.T.N., Brochiero, E., 2009. Molecular diversity and function of K⁺ channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 296, L145–155. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90525.2008>
- Barish, M.E., 1983. A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J. Physiol.* 342, 309–325. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014852>
- Blundell, C.D., Almond, A., Mahoney, D.J., DeAngelis, P.L., Campbell, I.D., Day, A.J., 2005. Towards a structure for a TSG-6-hyaluronan complex by modeling and NMR spectroscopy: insights into other members of the link module superfamily. *J. Biol. Chem.* 280, 18189–18201. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414343200>
- Boers, J.E., Ambergen, A.W., Thunnissen, F.B., 1998. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 2000–2006. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.6.9707011>
- Boers, J.E., den Brok, J.L., Koudstaal, J., Arends, J.W., Thunnissen, F.B., 1996. Number and proliferation of neuroendocrine cells in normal human airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 758–763. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.3.8810616>
- Bonfield, T.L., Konstan, M.W., Burfeind, P., Panuska, J.R., Hilliard, J.B., Berger, M., 1995a. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13, 257–261. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.13.3.7544594>
- Bonfield, T.L., Panuska, J.R., Konstan, M.W., Hilliard, K.A., Hilliard, J.B., Ghnaim, H., Berger, M., 1995b. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152, 2111–2118. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.152.6.8520783>
- Boodoo, S., Spannhake, E.W., Powell, J.D., Horton, M.R., 2006. Differential regulation of hyaluronan-induced IL-8 and IP-10 in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 291, L479–486. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00518.2005>
- Boucher, R.C., Cheng, E.H., Paradiso, A.M., Stutts, M.J., Knowles, M.R., Earp, H.S., 1989. Chloride secretory response of cystic fibrosis human airway epithelia. Preservation of calcium but not protein kinase C- and A-dependent mechanisms. *J. Clin. Invest.* 84, 1424–1431. <https://doi.org/10.1172/JCI114316>

- Bourguignon, L.Y., Zhu, H., Shao, L., Chen, Y.W., 2000. CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *J. Biol. Chem.* 275, 1829–1838. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.1829>
- Bourguignon, L.Y.W., Ramez, M., Gilad, E., Singleton, P.A., Man, M.-Q., Crumrine, D.A., Elias, P.M., Feingold, K.R., 2006. Hyaluronan-CD44 interaction stimulates keratinocyte differentiation, lamellar body formation/secretion, and permeability barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1356–1365. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700260>
- Breeze, R.G., Wheeldon, E.B., 1977. The cells of the pulmonary airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 116, 705–777. <https://doi.org/10.1164/arrd.1977.116.4.705>
- Brézillon, S., Zahm, J.M., Pierrot, D., Gaillard, D., Hinnrasky, J., Millart, H., Klossek, J.M., Tümmler, B., Puchelle, E., 1997. ATP depletion induces a loss of respiratory epithelium functional integrity and down-regulates CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) expression. *J. Biol. Chem.* 272, 27830–27838. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.44.27830>
- Bruscia, E.M., Zhang, P.-X., Ferreira, E., Caputo, C., Emerson, J.W., Tuck, D., Krause, D.S., Egan, M.E., 2009. Macrophages directly contribute to the exaggerated inflammatory response in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator^{-/-} mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 295–304. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-01700C>
- Bui, S., Boisserie-Lacroix, V., Ceccato, F., Clouzeau, H., Debeleix, S., Fayon, M., 2012. [Pulmonary inflammation in cystic fibrosis]. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr.* 19 Suppl 1, S8-12. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(12\)71100-4](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(12)71100-4)
- Canessa, C.M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J.D., Rossier, B.C., 1994. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367, 463–467. <https://doi.org/10.1038/367463a0>
- Cantin, A.M., Fells, G.A., Hubbard, R.C., Crystal, R.G., 1990. Antioxidant macromolecules in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract. *J. Clin. Invest.* 86, 962–971. <https://doi.org/10.1172/JCI114798>
- Capurro, V., Tomati, V., Sondo, E., Renda, M., Borrelli, A., Pastorino, C., Guidone, D., Venturini, A., Giraud, A., Mandrup Bertozzi, S., Musante, I., Bertozzi, F., Bandiera, T., Zara, F., Galiotta, L.J.V., Pedemonte, N., 2021. Partial Rescue of F508del-CFTR Stability and Trafficking Defects by Double Corrector Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5262. <https://doi.org/10.3390/ijms22105262>
- Casalino-Matsuda, S.M., Monzon, M.E., Conner, G.E., Salathe, M., Forteza, R.M., 2004. Role of hyaluronan and reactive oxygen species in tissue kallikrein-mediated epidermal growth factor receptor activation in human airways. *J. Biol. Chem.* 279, 21606–21616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309950200>
- Casalino-Matsuda, S.M., Monzon, M.E., Day, A.J., Forteza, R.M., 2009. Hyaluronan fragments/CD44 mediate oxidative stress-induced MUC5B up-regulation in airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 277–285. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-00730C>

- Cassatella, M.A., 1999. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.* 73, 369–509. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60791-9](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60791-9)
- Castellani, C., Cuppens, H., Macek, M., Cassiman, J.J., Kerem, E., Durie, P., Tullis, E., Assael, B.M., Bombieri, C., Brown, A., Casals, T., Claustres, M., Cutting, G.R., Dequeker, E., Dodge, J., Doull, I., Farrell, P., Ferec, C., Girodon, E., Johannesson, M., Kerem, B., Knowles, M., Munck, A., Pignatti, P.F., Radojkovic, D., Rizzotti, P., Schwarz, M., Stuhmann, M., Tzetis, M., Zielenski, J., Elborn, J.S., 2008. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 7, 179–196. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2008.03.009>
- Castellani, S., Favia, M., Guerra, L., Carbone, A., Abbattiscianni, A.C., Di Gioia, S., Casavola, V., Conese, M., 2017. Emerging relationship between CFTR, actin and tight junction organization in cystic fibrosis airway epithelium. *Histol. Histopathol.* 32, 445–459. <https://doi.org/10.14670/HH-11-842>
- Castranova, V., Rabovsky, J., Tucker, J.H., Miles, P.R., 1988. The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 93, 472–483. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(88\)90051-8](https://doi.org/10.1016/0041-008x(88)90051-8)
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., D’Andrea, A.D., 2016. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.* 26, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>
- Chang, M.-H., Plata, C., Sindic, A., Ranatunga, W.K., Chen, A.-P., Zandi-Nejad, K., Chan, K.W., Thompson, J., Mount, D.B., Romero, M.F., 2009. Slc26a9 is inhibited by the R-region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via the STAS domain. *J. Biol. Chem.* 284, 28306–28318. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.001669>
- Chappe, V., Hinkson, D.A., Howell, L.D., Evagelidis, A., Liao, J., Chang, X.-B., Riordan, J.R., Hanrahan, J.W., 2004. Stimulatory and inhibitory protein kinase C consensus sequences regulate the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 390–395. <https://doi.org/10.1073/pnas.0303411101>
- Chappe, V., Hinkson, D.A., Zhu, T., Chang, X.-B., Riordan, J.R., Hanrahan, J.W., 2003. Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA. *J. Physiol.* 548, 39–52. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.035790>
- Cheng, P.C., Alexiou, S., Rubenstein, R.C., 2019. Safety and efficacy of treatment with lumacaftor in combination with ivacaftor in younger patients with cystic fibrosis. *Expert Rev. Respir. Med.* 13, 417–423. <https://doi.org/10.1080/17476348.2019.1602040>
- Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., White, G.A., O’Riordan, C.R., Smith, A.E., 1990. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63, 827–834. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90148-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90148-8)
- Cheng, S.H., Rich, D.P., Marshall, J., Gregory, R.J., Welsh, M.J., Smith, A.E., 1991. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* 66, 1027–1036. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90446-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90446-6)

- Cid, L.P., Montrose-Rafizadeh, C., Smith, D.I., Guggino, W.B., Cutting, G.R., 1995. Cloning of a putative human voltage-gated chloride channel (CIC-2) cDNA widely expressed in human tissues. *Hum. Mol. Genet.* 4, 407–413. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.3.407>
- Clancy, J.P., Cotton, C.U., Donaldson, S.H., Solomon, G.M., VanDevanter, D.R., Boyle, M.P., Gentsch, M., Nick, J.A., Illek, B., Wallenburg, J.C., Sorscher, E.J., Amaral, M.D., Beekman, J.M., Naren, A.P., Bridges, R.J., Thomas, P.J., Cutting, G., Rowe, S., Durmowicz, A.G., Mense, M., Boeck, K.D., Skach, W., Penland, C., Joseloff, E., Bihler, H., Mahoney, J., Borowitz, D., Tuggle, K.L., 2019. CFTR modulator theratyping: Current status, gaps and future directions. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 18, 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.05.004>
- Clancy, J.P., Rowe, S.M., Accurso, F.J., Aitken, M.L., Amin, R.S., Ashlock, M.A., Ballmann, M., Boyle, M.P., Bronsveld, I., Campbell, P.W., De Boeck, K., Donaldson, S.H., Dorkin, H.L., Dunitz, J.M., Durie, P.R., Jain, M., Leonard, A., McCoy, K.S., Moss, R.B., Pilewski, J.M., Rosenbluth, D.B., Rubenstein, R.C., Schechter, M.S., Botfield, M., Ordoñez, C.L., Spencer-Green, G.T., Vernillet, L., Wisseh, S., Yen, K., Konstan, M.W., 2012. Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax* 67, 12–18. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200393>
- Cohen, T.S., Prince, A., 2012. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat. Med.* 18, 509–519. <https://doi.org/10.1038/nm.2715>
- Cohen-Cymerknoh, M., Kerem, E., Ferkol, T., Elizur, A., 2013. Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications. *Thorax* 68, 1157–1162. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2013-203204>
- Collins, F.S., 1992. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256, 774–779. <https://doi.org/10.1126/science.1375392>
- Corvol, H., Blackman, S.M., Boëlle, P.-Y., Gallins, P.J., Pace, R.G., Stonebraker, J.R., Accurso, F.J., Clement, A., Collaco, J.M., Dang, H., Dang, A.T., Franca, A., Gong, J., Guillot, L., Keenan, K., Li, W., Lin, F., Patrone, M.V., Raraigh, K.S., Sun, L., Zhou, Y.-H., O’Neal, W.K., Sontag, M.K., Levy, H., Durie, P.R., Rommens, J.M., Drumm, M.L., Wright, F.A., Strug, L.J., Cutting, G.R., Knowles, M.R., 2015. Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nat. Commun.* 6, 8382. <https://doi.org/10.1038/ncomms9382>
- Corvol, H., Flamant, C., Vallet, C., Clement, A., Brouard, J., 2006. [Modifier genes and cystic fibrosis]. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr.* 13, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2005.09.029>
- Cowley, E.A., Linsdell, P., 2002. Characterization of basolateral K⁺ channels underlying anion secretion in the human airway cell line Calu-3. *J. Physiol.* 538, 747–757. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013300>
- Crapo, J.D., Barry, B.E., Gehr, P., Bachofen, M., Weibel, E.R., 1982. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126, 332–337. <https://doi.org/10.1164/arrd.1982.126.2.332>

- Crawford, D.K., Mullenders, J., Pott, J., Boj, S.F., Landskroner-Eiger, S., Goddeeris, M.M., 2021. Targeting G542X CFTR nonsense alleles with ELX-02 restores CFTR function in human-derived intestinal organoids. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 20, 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2021.01.009>
- Crawford, I., Maloney, P.C., Zeitlin, P.L., Guggino, W.B., Hyde, S.C., Turley, H., Gatter, K.C., Harris, A., Higgins, C.F., 1991. Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9262–9266. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.20.9262>
- Cuthbert, A.W., 1991. Cystic fibrosis. 4. Abnormalities of airway epithelial function and the implications of the discovery of the cystic fibrosis gene. *Thorax* 46, 124–130. <https://doi.org/10.1136/thx.46.2.124>
- Dagenais, A., Boncoeur, E., Berthiaume, Y., 2009. [Na⁺ Transport in the lungs: differential impact of ENaC in the airways and alveoli]. *Med. Sci. MS* 25, 815–820. <https://doi.org/10.1051/medsci/20092510815>
- Dakin, C.J., Numa, A.H., Wang, H., Morton, J.R., Vertzyas, C.C., Henry, R.L., 2002. Inflammation, infection, and pulmonary function in infants and young children with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 904–910. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.7.2010139>
- Dalemans, W., Hinnrasky, J., Slos, P., Dreyer, D., Fuchey, C., Pavirani, A., Puchelle, E., 1992. Immunocytochemical analysis reveals differences between the subcellular localization of normal and delta Phe508 recombinant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Exp. Cell Res.* 201, 235–240. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(92\)90368-i](https://doi.org/10.1016/0014-4827(92)90368-i)
- Daniely, Y., Liao, G., Dixon, D., Linnoila, R.I., Lori, A., Randell, S.H., Oren, M., Jetten, A.M., 2004. Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, C171–181. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00226.2003>
- Davis, C.W., Lazarowski, E., 2008. Coupling of airway ciliary activity and mucin secretion to mechanical stresses by purinergic signaling. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 163, 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.05.015>
- Day, A.J., de la Motte, C.A., 2005. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol.* 26, 637–643. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.09.009>
- Dean, T.P., Dai, Y., Shute, J.K., Church, M.K., Warner, J.O., 1993. Interleukin-8 concentrations are elevated in bronchoalveolar lavage, sputum, and sera of children with cystic fibrosis. *Pediatr. Res.* 34, 159–161. <https://doi.org/10.1203/00006450-199308000-00010>
- Del Porto, P., Cifani, N., Guarnieri, S., Di Domenico, E.G., Mariggiò, M.A., Spadaro, F., Guglietta, S., Anile, M., Venuta, F., Quattrucci, S., Ascenzioni, F., 2011. Dysfunctional CFTR alters the bactericidal activity of human macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 6, e19970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019970>

- Delacourt, C., 2003. [Inflammation and cystic fibrosis]. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr.* 10 Suppl 2, 338s–341s. [https://doi.org/10.1016/s0929-693x\(03\)90049-2](https://doi.org/10.1016/s0929-693x(03)90049-2)
- Delavoie, F., Molinari, M., Milliot, M., Zahm, J.-M., Coraux, C., Michel, J., Balossier, G., 2009. Salmeterol restores secretory functions in cystic fibrosis airway submucosal gland serous cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 388–397. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0037OC>
- Delbrel, E., Uzunhan, Y., Soumare, A., Gille, T., Marchant, D., Planès, C., Boncoeur, E., 2019. ER Stress is Involved in Epithelial-To-Mesenchymal Transition of Alveolar Epithelial Cells Exposed to a Hypoxic Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* 20, E1299. <https://doi.org/10.3390/ijms20061299>
- Dequeker, E., Stuhmann, M., Morris, M.A., Casals, T., Castellani, C., Claustres, M., Cuppens, H., des Georges, M., Ferec, C., Macek, M., Pignatti, P.-F., Scheffer, H., Schwartz, M., Witt, M., Schwarz, M., Girodon, E., 2009. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 17, 51–65. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.136>
- Devaney, J.M., Greene, C.M., Taggart, C.C., Carroll, T.P., O'Neill, S.J., McElvaney, N.G., 2003. Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS Lett.* 544, 129–132. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00482-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00482-4)
- Dharmasathaphorn, K., Pandol, S.J., 1986. Mechanism of chloride secretion induced by carbachol in a colonic epithelial cell line. *J. Clin. Invest.* 77, 348–354. <https://doi.org/10.1172/JCI112311>
- Di, A., Brown, M.E., Deriy, L.V., Li, C., Szeto, F.L., Chen, Y., Huang, P., Tong, J., Naren, A.P., Bindokas, V., Palfrey, H.C., Nelson, D.J., 2006. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat. Cell Biol.* 8, 933–944. <https://doi.org/10.1038/ncb1456>
- Dicker, K.T., Gurski, L.A., Pradhan-Bhatt, S., Witt, R.L., Farach-Carson, M.C., Jia, X., 2014. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater.* 10, 1558–1570. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.019>
- Dinarello, C.A., 1999. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 11–24. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(99\)70518-x](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(99)70518-x)
- Donaldson, S.H., Boucher, R.C., 2007. Sodium channels and cystic fibrosis. *Chest* 132, 1631–1636. <https://doi.org/10.1378/chest.07-0288>
- Donaldson, S.H., Solomon, G.M., Zeitlin, P.L., Flume, P.A., Casey, A., McCoy, K., Zemanick, E.T., Mandagere, A., Troha, J.M., Shoemaker, S.A., Chmiel, J.F., Taylor-Cousar, J.L., 2017. Pharmacokinetics and safety of cavosonstat (N91115) in healthy and cystic fibrosis adults homozygous for F508DEL-CFTR. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 16, 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.01.009>

- Douglas, T.A., Brennan, S., Gard, S., Berry, L., Gangell, C., Stick, S.M., Clements, B.S., Sly, P.D., 2009. Acquisition and eradication of *P. aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 33, 305–311. <https://doi.org/10.1183/09031936.00043108>
- Dupuit, F., Kälin, N., Brézillon, S., Hinrasky, J., Tümmler, B., Puchelle, E., 1995. CFTR and differentiation markers expression in non-CF and delta F 508 homozygous CF nasal epithelium. *J. Clin. Invest.* 96, 1601–1611. <https://doi.org/10.1172/JCI118199>
- Eckford, P.D.W., Li, C., Ramjeesingh, M., Bear, C.E., 2012. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner. *J. Biol. Chem.* 287, 36639–36649. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.393637>
- Egan, M., Flotte, T., Afione, S., Solow, R., Zeitlin, P.L., Carter, B.J., Guggino, W.B., 1992. Defective regulation of outwardly rectifying Cl⁻ channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature* 358, 581–584. <https://doi.org/10.1038/358581a0>
- Emerson, J., Rosenfeld, M., McNamara, S., Ramsey, B., Gibson, R.L., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 34, 91–100. <https://doi.org/10.1002/ppul.10127>
- Engelhardt, J.F., Zepeda, M., Cohn, J.A., Yankaskas, J.R., Wilson, J.M., 1994. Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J. Clin. Invest.* 93, 737–749. <https://doi.org/10.1172/JCI117028>
- Evans, M.J., Cabral-Anderson, L.J., Freeman, G., 1978. Role of the Clara cell in renewal of the bronchiolar epithelium. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 38, 648–653.
- Evans, M.J., Cox, R.A., Shami, S.G., Wilson, B., Plopper, C.G., 1989. The role of basal cells in attachment of columnar cells to the basal lamina of the trachea. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1, 463–469. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/1.6.463>
- Fallacara, A., Baldini, E., Manfredini, S., Vertuani, S., 2018. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers* 10, E701. <https://doi.org/10.3390/polym10070701>
- Fayon, M., Chiron, R., Abely, M., pour le Groupe “Inflammation” de la Société Française de la Mucoviscidose, 2008. [Measurement of pulmonary inflammation in cystic fibrosis]. *Rev. Mal. Respir.* 25, 705–724. [https://doi.org/10.1016/s0761-8425\(08\)73800-2](https://doi.org/10.1016/s0761-8425(08)73800-2)
- Fehrenbach, H., 2001. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir. Res.* 2, 33–46. <https://doi.org/10.1186/rr36>
- Férec, C., 2021. [Cystic fibrosis: From gene discovery to precision medicine]. *Med. Sci. MS* 37, 618–624. <https://doi.org/10.1051/medsci/2021085>
- Flume, P.A., Biner, R.F., Downey, D.G., Brown, C., Jain, M., Fischer, R., De Boeck, K., Sawicki, G.S., Chang, P., Paz-Diaz, H., Rubin, J.L., Yang, Y., Hu, X., Pasta, D.J., Millar, S.J., Campbell, D., Wang, X., Ahluwalia, N., Owen, C.A., Wainwright, C.E., VX14-661-110 study group, 2021. Long-term safety and efficacy of tezacaftor-ivacaftor in individuals with cystic fibrosis aged 12 years or older who are homozygous or heterozygous for Phe508del CFTR (EXTEND): an open-label extension study. *Lancet Respir. Med.* 9, 733–746. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30510-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30510-5)

- Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V., Shipley, M.E., Smith, M.J., 1980. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286, 264–265. <https://doi.org/10.1038/286264a0>
- Forteza, R., Casalino-Matsuda, S.M., Monzon, M.E., Fries, E., Rugg, M.S., Milner, C.M., Day, A.J., 2007. TSG-6 potentiates the antitissue kallikrein activity of inter-alpha-inhibitor through bikunin release. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 36, 20–31. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0018OC>
- Forteza, R., Lieb, T., Aoki, T., Savani, R.C., Conner, G.E., Salathe, M., 2001. Hyaluronan serves a novel role in airway mucosal host defense. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15, 2179–2186. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0036com>
- Freedman, J.H., Ciriolo, M.R., Peisach, J., 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264, 5598–5605.
- Gabriel, S.E., Clarke, L.L., Boucher, R.C., Stutts, M.J., 1993. CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* 363, 263–268. <https://doi.org/10.1038/363263a0>
- Gadsby, D.C., Nairn, A.C., 1999. Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol. Rev.* 79, S77–S107. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.S77>
- Gagnon, K.B., Di Fulvio, M., 2013. A molecular analysis of the Na(+)-independent cation chloride cotransporters. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 32, 14–31. <https://doi.org/10.1159/000356621>
- Gall, Y., 2010. [Hyaluronic acid: structure, metabolism and implication in cicatrisation]. *Ann. Dermatol. Venereol.* 137 Suppl 1, S30–39. [https://doi.org/10.1016/S0151-9638\(10\)70007-7](https://doi.org/10.1016/S0151-9638(10)70007-7)
- Gao, F., Yang, C.X., Mo, W., Liu, Y.W., He, Y.Q., 2008. Hyaluronan oligosaccharides are potential stimulators to angiogenesis via RHAMM mediated signal pathway in wound healing. *Clin. Investig. Med. Med. Clin. Exp.* 31, E106–116. <https://doi.org/10.25011/cim.v31i3.3467>
- Garty, H., Palmer, L.G., 1997. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol. Rev.* 77, 359–396. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.2.359>
- Gaudelli, N.M., Komor, A.C., Rees, H.A., Packer, M.S., Badran, A.H., Bryson, D.I., Liu, D.R., 2017. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551, 464–471. <https://doi.org/10.1038/nature24644>
- Gentzsch, M., Dang, H., Dang, Y., Garcia-Caballero, A., Suchindran, H., Boucher, R.C., Stutts, M.J., 2010. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator impedes proteolytic stimulation of the epithelial Na⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 285, 32227–32232. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155259>
- Geurts, M.H., de Poel, E., Amatngalim, G.D., Oka, R., Meijers, F.M., Kruisselbrink, E., van Mourik, P., Berkers, G., de Winter-de Groot, K.M., Michel, S., Muilwijk, D., Aalbers, B.L., Mullenders, J., Boj, S.F., Suen, S.W.F., Brunsveld, J.E., Janssens, H.M., Mall,

- M.A., Graeber, S.Y., van Boxtel, R., van der Ent, C.K., Beekman, J.M., Clevers, H., 2020. CRISPR-Based Adenine Editors Correct Nonsense Mutations in a Cystic Fibrosis Organoid Biobank. *Cell Stem Cell* 26, 503-510.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.01.019>
- Gibson, L.E., Cooke, R.E., 1959. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23, 545–549.
- Goerke, J., 1998. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim. Biophys. Acta* 1408, 79–89. [https://doi.org/10.1016/s0925-4439\(98\)00060-x](https://doi.org/10.1016/s0925-4439(98)00060-x)
- Gouëffic, Y., Guilluy, C., Guérin, P., Patra, P., Pacaud, P., Loirand, G., 2006. Hyaluronan induces vascular smooth muscle cell migration through RHAMM-mediated PI3K-dependent Rac activation. *Cardiovasc. Res.* 72, 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.07.017>
- Gray, R.D., Hardisty, G., Regan, K.H., Smith, M., Robb, C.T., Duffin, R., Mackellar, A., Felton, J.M., Paemka, L., McCullagh, B.N., Lucas, C.D., Dorward, D.A., McKone, E.F., Cooke, G., Donnelly, S.C., Singh, P.K., Stoltz, D.A., Haslett, C., McCray, P.B., Whyte, M.K.B., Rossi, A.G., Davidson, D.J., 2018. Delayed neutrophil apoptosis enhances NET formation in cystic fibrosis. *Thorax* 73, 134–144. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210134>
- Gruenert, D.C., Willems, M., Cassiman, J.J., Frizzell, R.A., 2004. Established cell lines used in cystic fibrosis research. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 3 Suppl 2, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2004.05.040>
- Guggino, W.B., Stanton, B.A., 2006. New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 426–436. <https://doi.org/10.1038/nrm1949>
- Haardt, M., Benharouga, M., Lechardeur, D., Kartner, N., Lukacs, G.L., 1999. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J. Biol. Chem.* 274, 21873–21877. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21873>
- Haas, M., Forbush, B., 2000. The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 515–534. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.515>
- Hajj, Rodolphe, Baranek, T., Le Naour, R., Lesimple, P., Puchelle, E., Coraux, C., 2007. Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 139–148. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0288>
- Hajj, R., Lesimple, P., Nawrocki-Raby, B., Birembaut, P., Puchelle, E., Coraux, C., 2007. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J. Pathol.* 211, 340–350. <https://doi.org/10.1002/path.2118>
- Hall, C.L., Wang, C., Lange, L.A., Turley, E.A., 1994. Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J. Cell Biol.* 126, 575–588. <https://doi.org/10.1083/jcb.126.2.575>

- Hammond, K.B., Turcios, N.L., Gibson, L.E., 1994. Clinical evaluation of the macroduct sweat collection system and conductivity analyzer in the diagnosis of cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 124, 255–260. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(94\)70314-0](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(94)70314-0)
- Hartl, D., Latzin, P., Hordijk, P., Marcos, V., Rudolph, C., Woischnik, M., Krauss-Etschmann, S., Koller, B., Reinhardt, D., Roscher, A.A., Roos, D., Griese, M., 2007. Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nat. Med.* 13, 1423–1430. <https://doi.org/10.1038/nm1690>
- Hartzell, C., Putzier, I., Arreola, J., 2005. Calcium-activated chloride channels. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 719–758. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.032003.154341>
- Hashimoto, R., Gupte, S.A., 2022. G6PD is a critical enabler of hypoxia-induced accumulation of macrophages and platelets in mice lungs and contributor to lung inflammation. *Vascul. Pharmacol.* 144, 106976. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2022.106976>
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., Kurachi, Y., 2010. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev.* 90, 291–366. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2009>
- Ho, K., Nichols, C.G., Lederer, W.J., Lytton, J., Vassilev, P.M., Kanazirska, M.V., Hebert, S.C., 1993. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362, 31–38. <https://doi.org/10.1038/362031a0>
- Hodge-Dufour, J., Noble, P.W., Horton, M.R., Bao, C., Wysoka, M., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Trinchieri, G., Puré, E., 1997. Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159, 2492–2500.
- Hoffman, R.M., Claypool, W.D., Katyal, S.L., Singh, G., Rogers, R.M., Dauber, J.H., 1987. Augmentation of rat alveolar macrophage migration by surfactant protein. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, 1358–1362. <https://doi.org/10.1164/arrd.1987.135.6.1358>
- Horton, M.R., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Bao, C., Noble, P.W., 1998. Regulation of hyaluronan-induced chemokine gene expression by IL-10 and IFN-gamma in mouse macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 160, 3023–3030.
- Huang, F., Rock, J.R., Harfe, B.D., Cheng, T., Huang, X., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 2009. Studies on expression and function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21413–21418. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911935106>
- Huang, T.-W., Chan, Y.-H., Su, H.-W., Chou, Y.-S., Young, T.-H., 2013. Increased mucociliary differentiation and aquaporins formation of respiratory epithelial cells on retinoic acid-loaded hyaluronan-derivative membranes. *Acta Biomater.* 9, 6783–6789. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.02.038>
- Huang, T.-W., Cheng, P.-W., Chan, Y.-H., Yeh, T.-H., Young, Y.-H., Young, T.-H., 2010. Regulation of ciliary differentiation of human respiratory epithelial cells by the receptor for hyaluronan-mediated motility on hyaluronan-based biomaterials. *Biomaterials* 31, 6701–6709. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.054>

- Hubbard, R.C., Fells, G., Gadek, J., Pacholok, S., Humes, J., Crystal, R.G., 1991. Neutrophil accumulation in the lung in alpha 1-antitrypsin deficiency. Spontaneous release of leukotriene B₄ by alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* 88, 891–897. <https://doi.org/10.1172/JCI115391>
- Hull-Ryde, E.A., Minges, J.T., Martino, M.E.B., Kato, T., Norris-Drouin, J.L., Ribeiro, C.M.P., 2021. IRE1 α Is a Therapeutic Target for Cystic Fibrosis Airway Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3063. <https://doi.org/10.3390/ijms22063063>
- Hummler, E., Barker, P., Gatzky, J., Beermann, F., Verdumo, C., Schmidt, A., Boucher, R., Rossier, B.C., 1996. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat. Genet.* 12, 325–328. <https://doi.org/10.1038/ng0396-325>
- Hwang, T.-C., Kirk, K.L., 2013. The CFTR ion channel: gating, regulation, and anion permeation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, a009498. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009498>
- Ideozu, J.E., Zhang, X., McColley, S., Levy, H., 2019. Transcriptome Profiling and Molecular Therapeutic Advances in Cystic Fibrosis: Recent Insights. *Genes* 10, E180. <https://doi.org/10.3390/genes10030180>
- Inoue, H., 1999. [Interleukin-8 and airway inflammation]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 37, 673–679.
- Jacquot, J., Puchelle, E., Hinrasky, J., Fuchey, C., Bettinger, C., Spilmont, C., Bonnet, N., Dieterle, A., Dreyer, D., Pavirani, A., 1993. Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway secretory glands. *Eur. Respir. J.* 6, 169–176.
- Jeffery, P.K., Li, D., 1997. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur. Respir. J.* 10, 1655–1662. <https://doi.org/10.1183/09031936.97.10071655>
- Jentsch, T.J., 2008. CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 43, 3–36. <https://doi.org/10.1080/10409230701829110>
- Jiang, D., Liang, J., Fan, J., Yu, S., Chen, S., Luo, Y., Prestwich, G.D., Mascarenhas, M.M., Garg, H.G., Quinn, D.A., Homer, R.J., Goldstein, D.R., Bucala, R., Lee, P.J., Medzhitov, R., Noble, P.W., 2005. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat. Med.* 11, 1173–1179. <https://doi.org/10.1038/nm1315>
- Jiang, D., Liang, J., Li, Y., Noble, P.W., 2006. The role of Toll-like receptors in non-infectious lung injury. *Cell Res.* 16, 693–701. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310085>
- Jiang, D., Liang, J., Noble, P.W., 2011. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol. Rev.* 91, 221–264. <https://doi.org/10.1152/physrev.00052.2009>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

- Johnson, L.A., Prevo, R., Clasper, S., Jackson, D.G., 2007. Inflammation-induced uptake and degradation of the lymphatic endothelial hyaluronan receptor LYVE-1. *J. Biol. Chem.* 282, 33671–33680. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702889200>
- Kaltreider, H.B., Curtis, J.L., Arraj, S.M., 1987. The mechanism of appearance of specific antibody-forming cells in lungs of inbred mice after immunization with sheep erythrocytes intratracheally. II. Dose-dependence and kinetics of appearance of antibody-forming cells in hilar lymph nodes and lungs of unprimed and primed mice. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, 87–92. <https://doi.org/10.1164/arrd.1987.135.1.87>
- Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L.C., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245, 1073–1080. <https://doi.org/10.1126/science.2570460>
- Khan, M.A., Ali, Z.S., Swezey, N., Grasemann, H., Palaniyar, N., 2019. Progression of Cystic Fibrosis Lung Disease from Childhood to Adulthood: Neutrophils, Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation, and NET Degradation. *Genes* 10, E183. <https://doi.org/10.3390/genes10030183>
- Khan, T.Z., Wagener, J.S., Bost, T., Martinez, J., Accurso, F.J., Riches, D.W., 1995. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 1075–1082. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/151.4.1075>
- Kharazmi, A., Schiøtz, P.O., Høiby, N., Baek, L., Döring, G., 1986. Demonstration of neutrophil chemotactic activity in the sputum of cystic fibrosis patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Eur. J. Clin. Invest.* 16, 143–148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1986.tb01321.x>
- Kim, Y.G., Cha, J., Chandrasegaran, S., 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1156–1160. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>
- Kobayashi, Y., 2008. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13, 2400–2407. <https://doi.org/10.2741/2853>
- Kobayashi, Y., Okamoto, A., Nishinari, K., 1994. Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights. *Biorheology* 31, 235–244. <https://doi.org/10.3233/bir-1994-31302>
- Kogan, I., Ramjeesingh, M., Li, C., Kidd, J.F., Wang, Y., Leslie, E.M., Cole, S.P.C., Bear, C.E., 2003. CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *EMBO J.* 22, 1981–1989. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg194>
- Kohri, K., Ueki, I.F., Shim, J.J., Burgel, P.R., Oh, Y.M., Tam, D.C., Dao-Pick, T., Nadel, J.A., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* induces MUC5AC production via epidermal growth factor receptor. *Eur. Respir. J.* 20, 1263–1270. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00001402>
- König, J., Schreiber, R., Voelcker, T., Mall, M., Kunzelmann, K., 2001. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) inhibits ENaC through an increase in the intracellular Cl⁻ concentration. *EMBO Rep.* 2, 1047–1051. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve232>

- Konstan, M.W., 2008. Ibuprofen therapy for cystic fibrosis lung disease: revisited. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 14, 567–573. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32831311e8>
- Konstan, M.W., Byard, P.J., Hoppel, C.L., Davis, P.B., 1995. Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 332, 848–854. <https://doi.org/10.1056/NEJM199503303321303>
- Konstan, M.W., Walenga, R.W., Hilliard, K.A., Hilliard, J.B., 1993. Leukotriene B4 markedly elevated in the epithelial lining fluid of patients with cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148, 896–901. https://doi.org/10.1164/ajrccm/148.4_Pt_1.896
- Kopito, R.R., 1999. Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol. Rev.* 79, S167-173. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.S167>
- Kothapalli, D., Flowers, J., Xu, T., Puré, E., Assoian, R.K., 2008. Differential activation of ERK and Rac mediates the proliferative and anti-proliferative effects of hyaluronan and CD44. *J. Biol. Chem.* 283, 31823–31829. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802934200>
- Kovach, M.A., Standiford, T.J., 2011. Toll like receptors in diseases of the lung. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1399–1406. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.05.013>
- Kowarik, M., Küng, S., Martoglio, B., Helenius, A., 2002. Protein folding during cotranslational translocation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* 10, 769–778. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00685-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00685-8)
- Kreda, S.M., Mall, M., Mengos, A., Rochelle, L., Yankaskas, J., Riordan, J.R., Boucher, R.C., 2005. Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia. *Mol. Biol. Cell* 16, 2154–2167. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-11-1010>
- Kunkel, S.L., Standiford, T., Kasahara, K., Strieter, R.M., 1991. Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Exp. Lung Res.* 17, 17–23. <https://doi.org/10.3109/01902149109063278>
- Kunzelmann, K., Tian, Y., Martins, J.R., Faria, D., Kongsuphol, P., Ousingsawat, J., Wolf, L., Schreiber, R., 2012. Airway epithelial cells--functional links between CFTR and anoctamin dependent Cl⁻ secretion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 1897–1900. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.06.011>
- Lataillade, J.-J., Albanese, P., Uzan, G., 2010. [Implication of hyaluronic acid in normal and pathological angiogenesis. Application for cellular engineering]. *Ann. Dermatol. Venereol.* 137 Suppl 1, S15-22. [https://doi.org/10.1016/S0151-9638\(10\)70004-1](https://doi.org/10.1016/S0151-9638(10)70004-1)
- Lee, B., Hong, G.-S., Lee, S.H., Kim, H., Kim, A., Hwang, E.M., Kim, J., Lee, M.G., Yang, J.-Y., Kweon, M.-N., Tse, C.-M., Mark, D., Oh, U., 2019. Anoctamin 1/TMEM16A controls intestinal Cl⁻ secretion induced by carbachol and cholera toxin. *Exp. Mol. Med.* 51, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0287-2>
- Lee, J.-A., Cho, A., Huang, E.N., Xu, Y., Quach, H., Hu, J., Wong, A.P., 2021. Gene therapy for cystic fibrosis: new tools for precision medicine. *J. Transl. Med.* 19, 452. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03099-4>

- Lee, R.H., Pulin, A.A., Seo, M.J., Kota, D.J., Ylostalo, J., Larson, B.L., Semprun-Prieto, L., Delafontaine, P., Prockop, D.J., 2009. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 5, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.003>
- Leonard, E.J., Yoshimura, T., 1990. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1 [interleukin-8]). *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2, 479–486. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/2.6.479>
- Lepissier, A., Addy, C., Hayes, K., Noel, S., Bui, S., Burgel, P.-R., Dupont, L., Eickmeier, O., Fayon, M., Leal, T., Lopes, C., Downey, D.G., Sermet-Gaudelus, I., 2021. Inflammation biomarkers in sputum for clinical trials in cystic fibrosis: current understanding and gaps in knowledge. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* S1569-1993(21)02111–1. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2021.10.009>
- Lesley, J., Gál, I., Mahoney, D.J., Cordell, M.R., Rugg, M.S., Hyman, R., Day, A.J., Mikecz, K., 2004. TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44. *J. Biol. Chem.* 279, 25745–25754. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313319200>
- Levy, H., Murphy, A., Zou, F., Gerard, C., Klanderman, B., Schuemann, B., Lazarus, R., García, K.C., Celedón, J.C., Drumm, M., Dahmer, M., Quasney, M., Schneck, K., Reske, M., Knowles, M.R., Pier, G.B., Lange, C., Weiss, S.T., 2009. IL1B polymorphisms modulate cystic fibrosis lung disease. *Pediatr. Pulmonol.* 44, 580–593. <https://doi.org/10.1002/ppul.21026>
- Li, Y., Heldin, P., 2001. Hyaluronan production increases the malignant properties of mesothelioma cells. *Br. J. Cancer* 85, 600–607. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1922>
- Lieb, T., Forteza, R., Salathe, M., 2000. Hyaluronic acid in cultured ovine tracheal cells and its effect on ciliary beat frequency in vitro. *J. Aerosol Med. Off. J. Int. Soc. Aerosols Med.* 13, 231–237. <https://doi.org/10.1089/jam.2000.13.231>
- Linsdell, P., Evagelidis, A., Hanrahan, J.W., 2000. Molecular determinants of anion selectivity in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *Biophys. J.* 78, 2973–2982. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76836-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76836-6)
- Linsdell, P., Hanrahan, J.W., 1998. Glutathione permeability of CFTR. *Am. J. Physiol.* 275, C323–326. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.275.1.C323>
- Lopes-Pacheco, M., 2019. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front. Pharmacol.* 10, 1662. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01662>
- Lu, M., Leng, Q., Egan, M.E., Caplan, M.J., Boulpaep, E.L., Giebisch, G.H., Hebert, S.C., 2006. CFTR is required for PKA-regulated ATP sensitivity of Kir1.1 potassium channels in mouse kidney. *J. Clin. Invest.* 116, 797–807. <https://doi.org/10.1172/JCI26961>
- Lubamba, B.A., 2017. [XBP1 and inflammation in cystic fibrosis alveolar macrophages]. *Med. Sci. MS* 33, 380–382. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173304004>

- Lukacs, G.L., Chang, X.B., Kartner, N., Rotstein, O.D., Riordan, J.R., Grinstein, S., 1992. The cystic fibrosis transmembrane regulator is present and functional in endosomes. Role as a determinant of endosomal pH. *J. Biol. Chem.* 267, 14568–14572.
- Lukacs, G.L., Mohamed, A., Kartner, N., Chang, X.B., Riordan, J.R., Grinstein, S., 1994. Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J.* 13, 6076–6086.
- Lukacsovich, T., Yang, D., Waldman, A.S., 1994. Repair of a specific double-strand break generated within a mammalian chromosome by yeast endonuclease I-SceI. *Nucleic Acids Res.* 22, 5649–5657. <https://doi.org/10.1093/nar/22.25.5649>
- Mackey, J.E., Anbar, R.D., 2004. High-dose ibuprofen therapy associated with esophageal ulceration after pneumonectomy in a patient with cystic fibrosis: a case report. *BMC Pediatr.* 4, 19. <https://doi.org/10.1186/1471-2431-4-19>
- Mahoney, D.J., Blundell, C.D., Day, A.J., 2001. Mapping the hyaluronan-binding site on the link module from human tumor necrosis factor-stimulated gene-6 by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 276, 22764–22771. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100666200>
- Manzanares, D., Monzon, M.-E., Savani, R.C., Salathe, M., 2007. Apical oxidative hyaluronan degradation stimulates airway ciliary beating via RHAMM and RON. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 37, 160–168. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0413OC>
- Matsui, H., Grubb, B.R., Tarran, R., Randell, S.H., Gatzky, J.T., Davis, C.W., Boucher, R.C., 1998. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95, 1005–1015. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81724-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81724-9)
- McCarty, N.A., Zhang, Z.R., 2001. Identification of a region of strong discrimination in the pore of CFTR. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281, L852–867. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.281.4.L852>
- McKee, C.M., Penno, M.B., Cowman, M., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Bao, C., Noble, P.W., 1996. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J. Clin. Invest.* 98, 2403–2413. <https://doi.org/10.1172/JCI119054>
- Mege, J.-L., Capo, C., 2010. [Is macrophage polarization the Gordian knot of bacterial infections?]. *Med. Sci.* MS 26, 83–88. <https://doi.org/10.1051/medsci/201026183>
- Mekus, F., Ballmann, M., Bronsveld, I., Bijman, J., Veeze, H., Tümmler, B., 2000. Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. *Twin Res. Off. J. Int. Soc. Twin Stud.* 3, 277–293. <https://doi.org/10.1375/136905200320565256>
- Mennitt, P.A., Wade, J.B., Ecelbarger, C.A., Palmer, L.G., Frindt, G., 1997. Localization of ROMK channels in the rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 8, 1823–1830. <https://doi.org/10.1681/ASN.V8121823>

- Mercer, R.R., Russell, M.L., Roggli, V.L., Crapo, J.D., 1994. Cell number and distribution in human and rat airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10, 613–624. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.10.6.8003339>
- Meskini, M., Siadat, S.D., Seifi, S., Movafagh, A., Sheikhpour, M., 2021. An Overview on the Upper and Lower Airway Microbiome in Cystic Fibrosis Patients. *Tanaffos* 20, 86–98.
- Miguel, S.P., Simões, D., Moreira, A.F., Sequeira, R.S., Correia, I.J., 2019. Production and characterization of electrospun silk fibroin based asymmetric membranes for wound dressing applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 121, 524–535. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.041>
- Miledi, R., 1982. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 215, 491–497. <https://doi.org/10.1098/rspb.1982.0056>
- Mittal, M., Tirupathi, C., Nepal, S., Zhao, Y.-Y., Grzych, D., Soni, D., Prockop, D.J., Malik, A.B., 2016. TNF α -stimulated gene-6 (TSG6) activates macrophage phenotype transition to prevent inflammatory lung injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E8151–E8158. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614935113>
- Monslow, J., Govindaraju, P., Puré, E., 2015. Hyaluronan - a functional and structural sweet spot in the tissue microenvironment. *Front. Immunol.* 6, 231. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00231>
- Moore, A., Amselem, S., Duriez, B., Escudier, E., 2004. [Molecular basis of the primary ciliary dyskinesias]. *Rev. Mal. Respir.* 21, 521–526. [https://doi.org/10.1016/s0761-8425\(04\)71356-x](https://doi.org/10.1016/s0761-8425(04)71356-x)
- Moss, R.B., Flume, P.A., Elborn, J.S., Cooke, J., Rowe, S.M., McColley, S.A., Rubenstein, R.C., Higgins, M., VX11-770-110 (KONDUCT) Study Group, 2015. Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have an Arg117His-CFTR mutation: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Respir. Med.* 3, 524–533. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00201-5)
- Muhlebach, M.S., Stewart, P.W., Leigh, M.W., Noah, T.L., 1999. Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 186–191. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.1.9808096>
- Murray, C.B., Morales, M.M., Flotte, T.R., McGrath-Morrow, S.A., Guggino, W.B., Zeitlin, P.L., 1995. CIC-2: a developmentally dependent chloride channel expressed in the fetal lung and downregulated after birth. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12, 597–604. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.12.6.7766424>
- Namkung, W., Yao, Z., Finkbeiner, W.E., Verkman, A.S., 2011. Small-molecule activators of TMEM16A, a calcium-activated chloride channel, stimulate epithelial chloride secretion and intestinal contraction. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 25, 4048–4062. <https://doi.org/10.1096/fj.11-191627>
- Ni, K., Gill, A., Tseng, V., Mikosz, A.M., Koike, K., Beatman, E.L., Xu, C.Y., Cao, D., Gally, F., Mould, K.J., Serban, K.A., Schweitzer, K.S., March, K.L., Janssen, W.J., Nozik-Grayck, E., Garantziotis, S., Petrache, I., 2018. Rapid clearance of heavy chain-modified

- hyaluronan during resolving acute lung injury. *Respir. Res.* 19, 107. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0812-1>
- Nichols, D.P., Chmiel, J.F., 2015. Inflammation and its genesis in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 50 Suppl 40, S39-56. <https://doi.org/10.1002/ppul.23242>
- Nogee, L.M., 2004. Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 601–623. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.134711>
- Ochoa, C., Garg, H., Hales, C., Quinn, D., 2011. Low molecular weight hyaluronan, via AP-1 and NF- κ B signalling, induces IL-8 in transformed bronchial epithelial cells. *Swiss Med. Wkly.* <https://doi.org/10.4414/smw.2011.13255>
- Oh, U., Jung, J., 2016. Cellular functions of TMEM16/anoctamin. *Pflugers Arch.* 468, 443–453. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1790-0>
- Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T., 1988. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 141, 1543–1549.
- Okuda, K., Dang, H., Kobayashi, Y., Carraro, G., Nakano, S., Chen, G., Kato, T., Asakura, T., Gilmore, R.C., Morton, L.C., Lee, R.E., Mascenik, T., Yin, W.-N., Barbosa Cardenas, S.M., O’Neal, Y.K., Minnick, C.E., Chua, M., Quinney, N.L., Gentsch, M., Anderson, C.W., Ghio, A., Matsui, H., Nagase, T., Ostrowski, L.E., Grubb, B.R., Olsen, J.C., Randell, S.H., Stripp, B.R., Tata, P.R., O’Neal, W.K., Boucher, R.C., 2021. Secretory Cells Dominate Airway CFTR Expression and Function in Human Airway Superficial Epithelia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 203, 1275–1289. <https://doi.org/10.1164/rccm.202008-3198OC>
- Olivença, D.V., Fonseca, L.L., Voit, E.O., Pinto, F.R., 2019. Thickness of the airway surface liquid layer in the lung is affected in cystic fibrosis by compromised synergistic regulation of the ENaC ion channel. *J. R. Soc. Interface* 16, 20190187. <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0187>
- Osika, E., Cavaillon, J.M., Chadelat, K., Boule, M., Fitting, C., Tournier, G., Clement, A., 1999. Distinct sputum cytokine profiles in cystic fibrosis and other chronic inflammatory airway disease. *Eur. Respir. J.* 14, 339–346. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.14b17.x>
- Pandey, M.S., Baggenstoss, B.A., Washburn, J., Harris, E.N., Weigel, P.H., 2013. The hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) activates NF- κ B-mediated gene expression in response to 40-400-kDa, but not smaller or larger, hyaluronans. *J. Biol. Chem.* 288, 14068–14079. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.442889>
- Pandey, M.S., Harris, E.N., Weigel, J.A., Weigel, P.H., 2008. The cytoplasmic domain of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) contains multiple endocytic motifs targeting coated pit-mediated internalization. *J. Biol. Chem.* 283, 21453–21461. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800886200>
- Pandey, M.S., Harris, E.N., Weigel, P.H., 2015. HARE-Mediated Endocytosis of Hyaluronan and Heparin Is Targeted by Different Subsets of Three Endocytic Motifs. *Int. J. Cell Biol.* 2015, 524707. <https://doi.org/10.1155/2015/524707>

- Pandey, M.S., Miller, C.M., Harris, E.N., Weigel, P.H., 2016. Activation of ERK and NF- κ B during HARE-Mediated Heparin Uptake Require Only One of the Four Endocytic Motifs. *PloS One* 11, e0154124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154124>
- Pastva, A.M., Wright, J.R., Williams, K.L., 2007. Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 4, 252–257. <https://doi.org/10.1513/pats.200701-018AW>
- Pasyk, E.A., Foskett, J.K., 1995. Mutant (delta F508) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel is functional when retained in endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270, 12347–12350. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.21.12347>
- Płóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K., Kwiatkowska, K., 2015. Cooperation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 72, 557–581. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1762-5>
- Powell, J.D., Horton, M.R., 2005. Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal. *Immunol. Res.* 31, 207–218. <https://doi.org/10.1385/IR:31:3:207>
- Prevo, R., Banerji, S., Ferguson, D.J., Clasper, S., Jackson, D.G., 2001. Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J. Biol. Chem.* 276, 19420–19430. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011004200>
- Puchelle, E., Gaillard, D., Ploton, D., Hinnrasky, J., Fuchey, C., Bouterin, M.C., Jacquot, J., Dreyer, D., Pavirani, A., Dalemans, W., 1992. Differential localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7, 485–491. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/7.5.485>
- Puchelle, E., Zahm, J.M., Duvivier, C., 1983. Spinability of bronchial mucus. Relationship with viscoelasticity and mucous transport properties. *Biorheology* 20, 239–249. <https://doi.org/10.3233/bir-1983-20214>
- Qu, Z., Hartzell, H.C., 2000. Anion permeation in Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J. Gen. Physiol.* 116, 825–844. <https://doi.org/10.1085/jgp.116.6.825>
- Quinton, P.M., 1983. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 301, 421–422. <https://doi.org/10.1038/301421a0>
- Ramsey, B.W., Davies, J., McElvaney, N.G., Tullis, E., Bell, S.C., Dřevínek, P., Griese, M., McKone, E.F., Wainwright, C.E., Konstan, M.W., Moss, R., Ratjen, F., Sermet-Gaudelus, I., Rowe, S.M., Dong, Q., Rodriguez, S., Yen, K., Ordoñez, C., Elborn, J.S., VX08-770-102 Study Group, 2011. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N. Engl. J. Med.* 365, 1663–1672. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1105185>
- Ratjen, F.A., 2009. Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. *Respir. Care* 54, 595–605. <https://doi.org/10.4187/aarc0427>
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning

- and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066–1073. <https://doi.org/10.1126/science.2475911>
- Rock, J.R., Onaitis, M.W., Rawlins, E.L., Lu, Y., Clark, C.P., Xue, Y., Randell, S.H., Hogan, B.L.M., 2009. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12771–12775. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906850106>
- Rosenstein, B.J., Cutting, G.R., 1998. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J. Pediatr.* 132, 589–595. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(98\)70344-0](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(98)70344-0)
- Rowe, S.M., Daines, C., Ringshausen, F.C., Kerem, E., Wilson, J., Tullis, E., Nair, N., Simard, C., Han, L., Ingenito, E.P., McKee, C., Lekstrom-Himes, J., Davies, J.C., 2017. Tezacaftor-Ivacaftor in Residual-Function Heterozygotes with Cystic Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 377, 2024–2035. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709847>
- Rowtree, R.K., Harris, A., 2003. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann. Hum. Genet.* 67, 471–485. <https://doi.org/10.1046/j.1469-1809.2003.00028.x>
- Rubenstein, R.C., Zeitlin, P.L., 2000. Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278, C259-267. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.2.C259>
- Ruffin, M., Mercier, J., Calmel, C., Mésinèle, J., Bigot, J., Sutanto, E.N., Kicic, A., Corvol, H., Guillot, L., 2020. Update on SLC6A14 in lung and gastrointestinal physiology and physiopathology: focus on cystic fibrosis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 77, 3311–3323. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03487-x>
- Russell, J.M., 2000. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol. Rev.* 80, 211–276. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.211>
- Saint-Criq, V., Gray, M.A., 2017a. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 74, 93–115. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2391-y>
- Saint-Criq, V., Gray, M.A., 2017b. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 74, 93–115. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2391-y>
- Sala, M.A., Jain, M., 2018. Tezacaftor for the treatment of cystic fibrosis. *Expert Rev. Respir. Med.* 12, 725–732. <https://doi.org/10.1080/17476348.2018.1507741>
- Sands, D., 2013. Transepithelial nasal potential difference (NPD) measurements in cystic fibrosis (CF). *Med. Wieku Rozwoj.* 17, 13–17.
- Schreiber, R., Nitschke, R., Greger, R., Kunzelmann, K., 1999. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 274, 11811–11816. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11811>
- Schreiber, R., Pavenstädt, H., Greger, R., Kunzelmann, K., 2000. Aquaporin 3 cloned from *Xenopus laevis* is regulated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett.* 475, 291–295. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01689-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01689-6)

- Schwiebert, E.M., 1999. ABC transporter-facilitated ATP conductive transport. *Am. J. Physiol.* 276, C1-8. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.1.C1>
- Schwiebert, E.M., Benos, D.J., Egan, M.E., Stutts, M.J., Guggino, W.B., 1999. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol. Rev.* 79, S145-166. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.S145>
- Schwiebert, E.M., Flotte, T., Cutting, G.R., Guggino, W.B., 1994. Both CFTR and outwardly rectifying chloride channels contribute to cAMP-stimulated whole cell chloride currents. *Am. J. Physiol.* 266, C1464-1477. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.5.C1464>
- Schwiebert, E.M., Morales, M.M., Devidas, S., Egan, M.E., Guggino, W.B., 1998. Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2674–2679. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2674>
- Sears, P.R., Thompson, K., Knowles, M.R., Davis, C.W., 2013. Human airway ciliary dynamics. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 304, L170-183. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00105.2012>
- Seibert, F.S., Jia, Y., Mathews, C.J., Hanrahan, J.W., Riordan, J.R., Loo, T.W., Clarke, D.M., 1997. Disease-associated mutations in cytoplasmic loops 1 and 2 of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator impede processing or opening of the channel. *Biochemistry* 36, 11966–11974. <https://doi.org/10.1021/bi9712652>
- Sermet-Gaudelus, I., Munck, A., Rota, M., Roussey, M., Feldmann, D., Nguyen-Khoa, T., Groupe de travail “Dépistage néonatal” de la Fédération des centres de ressources et de compétences de la mucoviscidose, 2010. [French guidelines for sweat test practice and interpretation for cystic fibrosis neonatal screening]. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr.* 17, 1349–1358. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2010.06.021>
- Serre, J.L., Mornet, E., Simon-Bouy, B., Boué, J., Boué, A., 1993. General cystic fibrosis mutations are usually missense mutations affecting two specific protein domains and associated with a specific RFLP marker haplotype. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 1, 287–295. <https://doi.org/10.1159/000472426>
- Sheehan, K.M., DeLott, L.B., West, R.A., Bonnema, J.D., DeHeer, D.H., 2004. Hyaluronic acid of high molecular weight inhibits proliferation and induces cell death in U937 macrophage cells. *Life Sci.* 75, 3087–3102. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.02.038>
- Sheppard, D.N., Rich, D.P., Ostedgaard, L.S., Gregory, R.J., Smith, A.E., Welsh, M.J., 1993. Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature* 362, 160–164. <https://doi.org/10.1038/362160a0>
- Sheppard, D.N., Welsh, M.J., 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* 79, S23-45. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.S23>
- Shi, S., Pang, C., Guo, S., Chen, Y., Ma, B., Qu, C., Ji, Q., An, H., 2020. Recent progress in structural studies on TMEM16A channel. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18, 714–722. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.03.015>

- Simonin-Le Jeune, K., Le Jeune, A., Jouneau, S., Belleguic, C., Roux, P.-F., Jaguin, M., Dimanche-Boitre, M.-T., Lecureur, V., Leclercq, C., Desrues, B., Brinchault, G., Gangneux, J.-P., Martin-Chouly, C., 2013. Impaired functions of macrophage from cystic fibrosis patients: CD11b, TLR-5 decrease and sCD14, inflammatory cytokines increase. *PLoS One* 8, e75667. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075667>
- Singh, A.K., Riederer, B., Chen, M., Xiao, F., Krabbenhöft, A., Engelhardt, R., Nylander, O., Soleimani, M., Seidler, U., 2010. The switch of intestinal Slc26 exchangers from anion absorptive to HCO₃⁻ secretory mode is dependent on CFTR anion channel function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298, C1057-1065. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00454.2009>
- Sokolowska, M., Chen, L.-Y., Eberlein, M., Martinez-Anton, A., Liu, Y., Alsaaty, S., Qi, H.-Y., Logun, C., Horton, M., Shelhamer, J.H., 2014. Low molecular weight hyaluronan activates cytosolic phospholipase A2 α and eicosanoid production in monocytes and macrophages. *J. Biol. Chem.* 289, 4470–4488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.515106>
- Soleimani, M., 2013. SLC26 Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers in the kidney: roles in health and disease. *Kidney Int.* 84, 657–666. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.138>
- Solomon, G.M., Bronsveld, I., Hayes, K., Wilschanski, M., Melotti, P., Rowe, S.M., Sernet-Gaudelus, I., 2018. Standardized Measurement of Nasal Membrane Transepithelial Potential Difference (NPD). *J. Vis. Exp. JoVE.* <https://doi.org/10.3791/57006>
- Sonneville, F., Ruffin, M., Coraux, C., Rousselet, N., Le Rouzic, P., Blouquit-Laye, S., Corvol, H., Tabary, O., 2017. MicroRNA-9 downregulates the ANO1 chloride channel and contributes to cystic fibrosis lung pathology. *Nat. Commun.* 8, 710. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00813-z>
- Spitz, D.R., Kinter, M.T., Roberts, R.J., 1995. Contribution of increased glutathione content to mechanisms of oxidative stress resistance in hydrogen peroxide resistant hamster fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 165, 600–609. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041650318>
- Stephenson, A.L., Sykes, J., Stanojevic, S., Quon, B.S., Marshall, B.C., Petren, K., Ostrenga, J., Fink, A.K., Elbert, A., Goss, C.H., 2017. Survival Comparison of Patients With Cystic Fibrosis in Canada and the United States: A Population-Based Cohort Study. *Ann. Intern. Med.* 166, 537–546. <https://doi.org/10.7326/M16-0858>
- Stone, K.C., Mercer, R.R., Gehr, P., Stockstill, B., Crapo, J.D., 1992. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6, 235–243. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/6.2.235>
- Stutts, M.J., Canessa, C.M., Olsen, J.C., Hamrick, M., Cohn, J.A., Rossier, B.C., Boucher, R.C., 1995. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269, 847–850. <https://doi.org/10.1126/science.7543698>
- Tabary, O., Escotte, S., Couetil, J.P., Hubert, D., Dusser, D., Puchelle, E., Jacquot, J., 1999. Genistein inhibits constitutive and inducible NF κ B activation and decreases IL-8 production by human cystic fibrosis bronchial gland cells. *Am. J. Pathol.* 155, 473–481. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65143-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65143-7)

- Tabary, O., Zahm, J.M., Hinnrasky, J., Couetil, J.P., Cornillet, P., Guenounou, M., Gaillard, D., Puchelle, E., Jacquot, J., 1998. Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro. *Am. J. Pathol.* 153, 921–930. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65633-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65633-7)
- Taggart, C., Coakley, R.J., Grealley, P., Canny, G., O’Neill, S.J., McElvaney, N.G., 2000. Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278, L33-41. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.278.1.L33>
- Takahashi, Y., Li, L., Kamiryo, M., Asteriou, T., Moustakas, A., Yamashita, H., Heldin, P., 2005. Hyaluronan fragments induce endothelial cell differentiation in a CD44- and CXCL1/GRO1-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 280, 24195–24204. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411913200>
- Tamer, T.M., 2013. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdiscip. Toxicol.* 6, 111–125. <https://doi.org/10.2478/intox-2013-0019>
- Tanaka, R., Al-Jamal, R., Ludwig, M.S., 2001. Maturation changes in extracellular matrix and lung tissue mechanics. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 91, 2314–2321. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.5.2314>
- Tarran, R., 2004. Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 42–46. <https://doi.org/10.1513/pats.2306014>
- Tarran, R., Loewen, M.E., Paradiso, A.M., Olsen, J.C., Gray, M.A., Argent, B.E., Boucher, R.C., Gabriel, S.E., 2002. Regulation of murine airway surface liquid volume by CFTR and Ca²⁺-activated Cl⁻ conductances. *J. Gen. Physiol.* 120, 407–418. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028599>
- Taylor, K.R., Yamasaki, K., Radek, K.A., Di Nardo, A., Goodarzi, H., Golenbock, D., Beutler, B., Gallo, R.L., 2007. Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J. Biol. Chem.* 282, 18265–18275. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606352200>
- Taylor-Cousar, J.L., Munck, A., McKone, E.F., van der Ent, C.K., Moeller, A., Simard, C., Wang, L.T., Ingenito, E.P., McKee, C., Lu, Y., Lekstrom-Himes, J., Elborn, J.S., 2017. Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N. Engl. J. Med.* 377, 2013–2023. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709846>
- Termeer, C.C., Hennies, J., Voith, U., Ahrens, T., Weiss, J.M., Prehm, P., Simon, J.C., 2000. Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 165, 1863–1870. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.4.1863>
- Tian, X., Azpurua, J., Hine, C., Vaidya, A., Myakishev-Rempel, M., Ablueva, J., Mao, Z., Nevo, E., Gorbunova, V., Seluanov, A., 2013. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat. *Nature* 499, 346–349. <https://doi.org/10.1038/nature12234>
- Tominaga, K., Yoshimoto, T., Torigoe, K., Kurimoto, M., Matsui, K., Hada, T., Okamura, H., Nakanishi, K., 2000. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production

- from human T cells. *Int. Immunol.* 12, 151–160. <https://doi.org/10.1093/intimm/12.2.151>
- Trinh, N.T.N., Privé, A., Kheir, L., Bourret, J.-C., Hijazi, T., Amraei, M.G., Noël, J., Brochiero, E., 2007. Involvement of KATP and KvLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293, L870–882. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00362.2006>
- Tsui, L.C., Buchwald, M., Barker, D., Braman, J.C., Knowlton, R., Schumm, J.W., Eiberg, H., Mohr, J., Kennedy, D., Plavsic, N., 1985. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 230, 1054–1057. <https://doi.org/10.1126/science.2997931>
- Turley, E.A., Noble, P.W., Bourguignon, L.Y.W., 2002. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 4589–4592. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100038200>
- Turner, J., Roger, J., Fitau, J., Combe, D., Giddings, J., Heeke, G.V., Jones, C.E., 2011. Goblet cells are derived from a FOXJ1-expressing progenitor in a human airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 276–284. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0304OC>
- Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuys, P.D.J., Burton, B., Stack, J.H., Straley, K.S., Decker, C.J., Miller, M., McCartney, J., Olson, E.R., Wine, J.J., Frizzell, R.A., Ashlock, M., Negulescu, P.A., 2011. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18843–18848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105787108>
- Van Goor, F., Yu, H., Burton, B., Hoffman, B.J., 2014. Effect of ivacaftor on CFTR forms with missense mutations associated with defects in protein processing or function. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 13, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2013.06.008>
- Venturini, A., Borrelli, A., Musante, I., Scudieri, P., Capurro, V., Renda, M., Pedemonte, N., Galiotta, L.J.V., 2021. Comprehensive Analysis of Combinatorial Pharmacological Treatments to Correct Nonsense Mutations in the CFTR Gene. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 11972. <https://doi.org/10.3390/ijms222111972>
- Vigetti, D., Karousou, E., Viola, M., Deleonibus, S., De Luca, G., Passi, A., 2014. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 2452–2459. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.001>
- Wang, H., Long, X.-B., Cao, P.-P., Wang, N., Liu, Y., Cui, Y.-H., Huang, S.-K., Liu, Z., 2010. Clara cell 10-kD protein suppresses chitinase 3-like 1 expression associated with eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181, 908–916. <https://doi.org/10.1164/rccm.200904-0597OC>
- Wang, Q., Curran, M.E., Splawski, I., Burn, T.C., Millholland, J.M., VanRaay, T.J., Shen, J., Timothy, K.W., Vincent, G.M., de Jager, T., Schwartz, P.J., Toubin, J.A., Moss, A.J., Atkinson, D.L., Landes, G.M., Connors, T.D., Keating, M.T., 1996. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat. Genet.* 12, 17–23. <https://doi.org/10.1038/ng0196-17>

- Wanner, A., Salathé, M., O’Riordan, T.G., 1996. Mucociliary clearance in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 1868–1902. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.6.8970383>
- Ward, C.L., Kopito, R.R., 1994. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 25710–25718.
- Weng, X., Maxwell-Warburton, S., Hasib, A., Ma, L., Kang, L., 2022. The membrane receptor CD44: novel insights into metabolism. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 33, 318–332. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2022.02.002>
- West, D.C., Kumar, S., 1989. The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp. Cell Res.* 183, 179–196. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(89\)90428-x](https://doi.org/10.1016/0014-4827(89)90428-x)
- Willumsen, N.J., Boucher, R.C., 1989. Shunt resistance and ion permeabilities in normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Am. J. Physiol.* 256, C1054–1063. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1989.256.5.C1054>
- Wong, A.P., Keating, A., Waddell, T.K., 2009. Airway regeneration: the role of the Clara cell secretory protein and the cells that express it. *Cytherapy* 11, 676–687. <https://doi.org/10.3109/14653240903313974>
- Wu, M., Du, Y., Liu, Y., He, Y., Yang, C., Wang, W., Gao, F., 2014. Low molecular weight hyaluronan induces lymphangiogenesis through LYVE-1-mediated signaling pathways. *PloS One* 9, e92857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092857>
- Xia, Y., Haws, C.M., Wine, J.J., 1997. Disruption of monolayer integrity enables activation of a cystic fibrosis “bypass” channel in human airway epithelia. *Nat. Med.* 3, 802–805. <https://doi.org/10.1038/nm0797-802>
- Xu, M., Wang, X., 2017. Critical roles of mucin-1 in sensitivity of lung cancer cells to tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone. *Cell Biol. Toxicol.* 33, 361–371. <https://doi.org/10.1007/s10565-017-9393-x>
- Yamawaki, H., Hirohata, S., Miyoshi, T., Takahashi, K., Ogawa, H., Shinohata, R., Demircan, K., Kusachi, S., Yamamoto, K., Ninomiya, Y., 2009. Hyaluronan receptors involved in cytokine induction in monocytes. *Glycobiology* 19, 83–92. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn109>
- Yang, B., Yang, B.L., Savani, R.C., Turley, E.A., 1994. Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *EMBO J.* 13, 286–296.
- Ye, Y., Zhao, J., Ye, J., Jiang, X., Liu, H., Xie, Y., Zhang, J., Luo, Q., 2019. The role of autophagy in the overexpression of MUC5AC in patients with chronic rhinosinusitis. *Int. Immunopharmacol.* 71, 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.03.028>
- Yu, M., Zhang, H., Liu, Y., He, Y., Yang, C., Du, Y., Wu, M., Zhang, G., Gao, F., 2015. The cooperative role of S1P3 with LYVE-1 in LMW-HA-induced lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* 336, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.06.014>

- Zahm, J.M., Gaillard, D., Dupuit, F., Hinnrasky, J., Porteous, D., Dorin, J.R., Puchelle, E., 1997. Early alterations in airway mucociliary clearance and inflammation of the lamina propria in CF mice. *Am. J. Physiol.* 272, C853-859. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.272.3.C853>
- Zahm, J.-M., Milliot, M., Bresin, A., Coraux, C., Birembaut, P., 2011. The effect of hyaluronan on airway mucus transport and airway epithelial barrier integrity: potential application to the cytoprotection of airway tissue. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 30, 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.07.003>
- Zahm, J.M., Pierrot, D., Vaquez-Girod, S., Duvivier, C., King, M., Puchelle, E., 1989. The role of mucus sol phase in clearance by simulated cough. *Biorheology* 26, 747–752. <https://doi.org/10.3233/bir-1989-26407>
- Zepp, J.A., Morrisey, E.E., 2019. Cellular crosstalk in the development and regeneration of the respiratory system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 551–566. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0141-3>
- Zhang, F., Kartner, N., Lukacs, G.L., 1998. Limited proteolysis as a probe for arrested conformational maturation of delta F508 CFTR. *Nat. Struct. Biol.* 5, 180–183. <https://doi.org/10.1038/nsb0398-180>
- Zhang, H., Liu, Q., Kong, L., Xu, S., 2019. Mucin 1 downregulation impairs the anti-necroptotic effects of glucocorticoids in human bronchial epithelial cells. *Life Sci.* 221, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.02.013>
- Zhang, Z., Liu, F., Chen, J., 2018. Molecular structure of the ATP-bound, phosphorylated human CFTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 12757–12762. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815287115>

Acide hyaluronique et inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose (CFILHA)

La Mucoviscidose (Cystic Fibrosis, CF) est une maladie génétique rare à transmission autosomique récessive, due à des mutations du gène CFTR codant le canal chlore CFTR. Elle affecte différents organes sécréteurs notamment le tissu pulmonaire, générant une déshydratation, un épaissement et une accumulation de mucus qui entraîne une altération de la clairance mucociliaire. La modification du mucus favorise des infections qui deviennent chroniques dans les voies aériennes et s'accompagnent d'une inflammation pulmonaire importante. Notre étude visait à analyser les effets de l'acide hyaluronique (AH) sur la modulation de l'inflammation bronchique dans la mucoviscidose dans le but de déterminer son rôle anti-inflammatoire potentiel dans cette pathologie ainsi que dans les pathologies respiratoires inflammatoires chroniques.

Pour notre étude, nous avons utilisé des lignées de cellules épithéliales bronchiques humaines non-CF et CF ainsi que des cellules primaires bronchiques humaines issues de sujets non-CF et patients CF (mutation F508del/F508del). Le premier objectif de ma thèse a été d'étudier l'effet de l'AH de 40 kDa, en condition contrôle ou en contexte inflammatoire, sur la sécrétion d'IL-8 par les différentes cellules épithéliales cultivées en monocouche. Nos résultats montrent que, bien que l'AH ne modifie pas la sécrétion d'IL-8 par les lignées cellulaires, il entraîne une réduction significative de cette sécrétion dans les cultures primaires bronchiques CF et non-CF soumises à une inflammation chronique. Le second objectif a consisté à définir l'effet anti-inflammatoire préventif et/ou curatif de l'AH de 40 kDa sur les cellules bronchiques en culture en monocouche mais également, pour les cellules épithéliales bronchiques primaires, en culture en interface air-liquide. Les résultats obtenus montrent que l'AH de 40 kDa ne semble pas présenter d'effet protecteur contre le développement de l'inflammation bronchique, mais réduit curativement l'inflammation des cellules épithéliales dans un contexte inflammatoire. Enfin, nous nous sommes intéressés aux mécanismes mis en jeu lors de ce processus, en ciblant spécifiquement les récepteurs CD44 et TLR-4, et la voie de signalisation NF- κ B. Nos résultats montrent qu'en condition contrôle, l'AH de 40 kDa, tout en induisant une phosphorylation d'I κ B- α , n'entraîne pas d'activation de NF- κ B, alors qu'en condition inflammatoire, aucune activation d'I κ B- α ou de NF- κ B n'est observée sous l'action de l'AH de 40 kDa.

En conclusion, l'AH de 40 kDa a montré des propriétés anti-inflammatoires pour l'épithélium bronchique humain non-CF et CF enflammé, et pourrait ainsi présenter une activité pharmacologique bénéfique dans les pathologies respiratoires inflammatoires chroniques, en particulier la CF.

Mots clés : Remodelage, épithélium bronchique, inflammation, acide hyaluronique, mucoviscidose

Hyaluronic acid and pulmonary inflammation in cystic fibrosis (CFILHA)

Cystic Fibrosis (CF) is an autosomal recessive genetic disease due to mutations in the CFTR gene encoding the CFTR chloride channel. CF affects various secretory organs, notably the lungs, leading to dehydration, thickening and accumulation of mucus in the airways, and consequently an alteration of the mucociliary clearance. This context favors airway chronic infections and inflammation. Our study aimed to analyze the effects of hyaluronic acid (HA) on the modulation of bronchial inflammation in cystic fibrosis in order to determine its potential anti-inflammatory role in this pathology as well as in chronic inflammatory respiratory diseases.

For our study, we used non-CF and CF cell lines, as well as human primary bronchial epithelial cells from non-CF subjects and CF patients (F508del/F508del mutation). The first objective of my thesis was to study the effect of 40 kDa-HA, in control condition or in an inflammatory context, on the secretion of IL-8 by the different epithelial cells cultured as monolayers. Our results showed that, although HA does not modify IL-8 secretion by cell lines, it leads to a significant reduction of this IL-8 secretion in inflamed primary non-CF and CF bronchial cultures. The second objective was to define the preventive and/or curative anti-inflammatory effect of 40 kDa-HA on CF bronchial cells cultured as monolayers and, for primary bronchial epithelial cells, at the air-liquid interface. The results we obtained showed that 40 kDa-HA does not seem to exhibit a protective effect against the development of bronchial inflammation, but curatively reduces the inflammation of epithelial cells in an inflammatory context. Finally, we focused on the mechanisms involved in this process, specifically targeting the CD44 and TLR-4 receptors, and the signaling pathways. Our results showed that in control condition, 40 kDa-HA, while inducing phosphorylation of, does not lead to activation of NF- κ B, whereas in inflammatory condition, no activation of I κ B α or NF- κ B is observed under the action of 40 kDa-HA.

In conclusion, 40 kDa-HA exhibits anti-inflammatory properties for non-CF and CF inflamed bronchial epitheliums, and therefore may show beneficial pharmacological activity in chronic inflammatory respiratory diseases, especially in CF.

Keywords : Remodeling, airway epithelium, inflammation, hyaluronic acid, cystic fibrosis

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Université de Reims Champagne-Ardenne

Inserm UMR-S 1250

Pathologies Pulmonaires et Plasticité Cellulaire (P3Cell)

45 rue Cognacq-Jay, CHU Maison-Blanche,
51092 REIMS CEDEX

