



Thèse de Doctorat

Jessica BELLEC

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Nantes sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans

École doctorale : Biologie - Santé

Discipline : Biologie – Santé Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie Unité de recherche : INSERM U1064

Soutenue le 12 décembre 2014 Thèse N :

Stratégies d'invalidation du gène *CFTR* dans les cellules épithéliales respiratoires humaines pour la mise au point d'un nouveau modèle de la mucoviscidose

	JUKT
Rapporteurs :	Carine GIOVANNANGELI, DR 1, CNRS UMR 7196 / INSERM U565, Paris, France Jean-Christophe PAGES, PU/PH, INSERM U966, Tours, France
Examinateurs :	Pascale FANEN, MCU/PH, IMRB INSERM U955, Créteil, France Claude FEREC, PU/PH, INSERM U1078, Brest, France
Directeur de Thèse :	Tuan Huy NGUYEN, CR 1, INSERM U1064, Nantes, France
Co-directeur de Thèse :	Marc CHANSON, Professeur associe, Laboratory of Clinical Investigation III, Genève, Suisse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Carine Giovannangeli et le Pr Jean-Christophe Pagès d'avoir accepté de juger ce manuscrit et de me faire bénéficier de leur avis critique, ainsi que le Dr Pascale Fanen et le Pr Claude Férec pour avoir accepté de faire partie de ce jury et par l'intérêt porté à ce travail. J'aimerais également remercier le Dr Oumeya Adjali et le Dr Bruno Pitard pour leur disponibilité lors de mes comités de thèse et leurs remarques constructives.

Je remercie le Dr Ignacio Anegon de m'avoir accueillie dans l'unité U1064 pour mener ce projet. Un merci particulier à Marc et Tuan, mes directeurs de thèse, pour la confiance que vous m'avez accordée, pour vos conseils et pour m'avoir guidée au cours de ces trois années. Je tiens aussi à remercier l'association Vaincre La Mucoviscidose pour avoir permis et soutenu financièrement ces travaux.

J'aimerais remercier mes collègues nantais pour leur aide et leur bonne humeur. Celles-ci sont précieuses quand la science n'avance pas comme on le souhaiterait. Un clin d'œil aux occupants du P2+ et notamment à Alison qui a partagé ces heures d'enfermement, surtout celles du vendredi après-midi. Un grand merci aux Genevois, le vrai et ceux d'adoption. Merci pour votre accueil, votre aide et le partage de la culture suisse, italienne et libanaise. Et n'oublions pas : le peu que je sais, c'est à mon ignorance que je le dois. De Dieu ! Une pensée particulière pour mes collègues « du midi » pour avoir écouté, soutenu, conseillé. Merci à vous Virginie et Liliane.

Plus personnellement, cette thèse ne peut se résumer aux trois dernières années. J'aimerais me rappeler toutes les personnes qui m'ont amenée jusqu'ici, celles qui m'ont donné le goût d'apprendre et de comprendre, celles qui m'ont poussée à croire en moi, celles aussi qui ne vous facilitent pas toujours la vie mais qui, pour ma part, ont plutôt forcé mon obstination, celles qui sont là dans les bons moments comme les moins bons.

A ma Maman et ma sœur, vous qui me portez et me supportez depuis toujours. A mon M.d.I, je ne sais pas où je vais, mais je marche mieux quand ma main serre la tienne. A mes trois P., j'espère que vous êtes fiers du petit Fripon. Il faut s'habituer aux échecs, garder confiance et recommencer aussi souvent qu'il le faut pour réussir. H. Reeves, *Je n'aurai pas le temps*, 2008

> Essentially, all models are wrong, but some are useful. G. Box et N. Draper, *Empirical Model Building and Response Surfaces*, 1987

SOMMAIRE

<u>SO</u>	MMAIRE
<u>LIS</u>	TE DES ABREVIATIONS5
<u>TAI</u>	BLE DES FIGURES ET TABLEAUX
<u>INT</u>	RODUCTION GENERALE
1.	PRESENTATION GENERALE DE LA MUCOVISCIDOSE
1.1	. UN PEU D'HISTOIRE
1.2	. Etiologie
1.	2.1. Localisation et structure du gène CFTR 11
1.	2.2. Classification des mutations du gène CFTR11
1.	2.3. Corrélations génotype-phénotype et existence de gènes modificateurs
1.3	. EPIDEMIOLOGIE
1.4	. MANIFESTATIONS CLINIQUES ASSOCIEES AU DEFAUT DU GENE CFTR
1.	4.1. Atteintes liées à la mucoviscidose15
1.	4.2. Les CFTR-opathies
2.	ROLE DU CFTR DANS L'ATTEINTE PULMONAIRE LIEE A LA MUCOVISCIDOSE
2.1	ORGANISATION DES EPITHELIUMS RESPIRATOIRES
2.	1.1. Anatomie de l'appareil respiratoire
2.	1.2. Les épithéliums respiratoires19
	2.1.2.1.L'épithélium malpighien
	2.1.2.2.L'épithélium pseudo-stratifié cilié19
	2.1.2.3.L'épithélium cuboïdal
	2.1.2.4.L'épithélium alvéolaire
2.2	. ROLES DU CANAL CFTR DANS LES TRANSPORTS TRANSEPITHELIAUX
2.	2.1. CFTR : un canal chlore aux effets pléiotropiques
2.	2.2. Transports transépithéliaux et rôles du canal CFTR 24
	2.2.2.1.Les canaux et transporteurs ioniques
	2.2.2.1.Les hémicanaux connexines et pannexines
	2.2.2.2.Les aquaporines
2.3	. CONSEQUENCES DU DYSFONCTIONNEMENT DU CFTR SUR LES FONCTIONS DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE 27
2.	3.1. Altération de la clairance mucociliaire
2.	3.2. Infection bactérienne chronique et interactions hôte-pathogènes
2.	3.3. Réponse inflammatoire délétère

2	2.3.4. Remodelage de l'épithélium pulmonaire	34
2.4	4. LA RECHERCHE CLINIQUE : VERS UNE NOUVELLE GENERATION DES APPROCHES THERAPEUTIQUES	37
2	2.4.1. Les modulateurs du CFTR mutation-spécifiques	37
2	2.4.2. Les voies alternatives de sécrétion ionique	37
2	2.4.3. Les stratégies d'hydratation du liquide de surface	38
2	2.4.4. Les agents antimicrobiens et anti-inflammatoires	38
2	2.4.5. La thérapie génique et cellulaire	39
3.	Les modeles d'etude de la mucoviscidose	40
3.1	1. LES LIGNEES CELLULAIRES IMMORTALISEES	40
З	3.1.1. Méthodes d'immortalisation des lignées cellulaires	40
З	3.1.2. Les lignées cellulaires utilisées dans le cadre de la recherche sur la mucoviscidose	41
3	3.1.3. Limitations associées aux lignées cellulaires immortalisées	47
3	3.1.4. Utilisation des cellules souches embryonnaires et pluripotentes induites humaines	47
3.2	2. LES CULTURES CELLULAIRES PRIMAIRES	49
3	3.2.1. De la culture des cellules primaires respiratoires humaines sur boites à la formation	
	d'épithéliums pseudo-stratifiés mucociliés	50
З	3.2.2. Limitations associées aux cultures cellulaires primaires	52
3.3	3. Les modeles animaux de la mucoviscidose	52
3	3.3.1. Les modèles murins	52
	3.3.1.1.Les modèles murins CF stricto sensu	52
	3.3.1.2.Les modèles murins d'infection à Pseudomonas aeruginosa	56
	3.3.1.3.Limitations associées aux modèles murins de la mucoviscidose	57
3	3.3.2. Les modèles de la mucoviscidose chez le gros animal	58
	3.3.2.1.Les modèles porcins	58
	3.3.2.2.Le modèle furet	60
	3.3.2.3.Limitations associées aux modèles de la mucoviscidose chez le gros animal	61
4.	Invalidation du gene CFTR pour la mise au point d'un modele cellulaire de la mucoviscidose	62
4.1	1. STRATEGIES DE MODIFICATION DE L'EXPRESSION GENETIQUE	62
4.2	2. INHIBITION PARTIELLE DE L'EXPRESSION GENETIQUE PAR LA VOIE DE L'INTERFERENCE ARN	63
4	1.2.1. Principe de l'interférence ARN	63
4	1.2.2. Les ARN non codants de la voie de l'interférence ARN	64
	4.2.2.1.Les miRNA	64
	4.2.2.2.Les siRNA	65
	4.2.2.3.Les shRNA	66
4	1.2.3. Les mécanismes et intervenants cellulaires de l'interférence ARN	66

	4.2.3.1.La voie de biosynthèse des miRNA, siRNA et shRNA	66
	4.2.3.2.Les mécanismes de répression de l'expression génétique	68
4	4.2.4. Les effets off	
4.3	3. MODIFICATION CIBLEE DU GENOME GRACE AUX ENDONUCLEASES ARTIFICIELLES	
4	4.3.1. La famille des endonucléases artificielles	
	4.3.1.1.Présentation générale	
	4.3.1.1.Les méganucléases	
	4.3.1.2.Les nucléases à doigt de zinc	
	4.3.1.3.Les TALE nucléases	
4	4.3.2. Le système CRISPR-Cas	
4	4.3.3. ZFNs, TALE nucléases ou CRISPR-Cas9 ?	80
4	4.3.4. Les voies cellulaires de la réparation des cassures double brin	82
	4.3.4.1.La ligation des extrémités non homologues	82
	4.3.4.2.La recombinaison homologue	
4.4	4. OUTILS DU TRANSFERT DE GENE	85
4	4.4.1. Vecteurs non-viraux	
4	4.4.2. Vecteurs viraux	
<u>O</u> E	BJECTIFS DE LA THESE	91
<u>RE</u>	ESULTATS ET CONCLUSIONS	95
1.	DEVELOPPEMENT DES OUTILS MOLECULAIRES POUR LA GENERATION DE LIGNEES CELLULAIRES CALU-3	
IM	IMORTALISEES ET D'EPITHELIUMS PRIMAIRES RESPIRATOIRES DIFFERENCIES INVALIDES POUR LE GENE CFTR	96
1.1	1. MATERIELS ET METHODES	
1.2	2. RESULTATS ET CONCLUSIONS	102
1	1.2.1. Stratégie de l'interférence ARN et séquences shRNA	102
	1.2.1.1.Sélection et criblage de séquences siRNA ciblant l'ARNm du gène CFTR	102
	1.2.1.2. Détermination de la séquence ou de la combinaison de séquences induisant la plu	s forte
	1.2.1.2. Détermination de la séquence ou de la combinaison de séquences induisant la plu invalidation du gène <i>CFTR</i>	s forte 105
1	1.2.1.2.Détermination de la séquence ou de la combinaison de séquences induisant la plu invalidation du gène <i>CFTR</i> 1.2.2. Stratégie d'édition du gène CFTR et endonucléases artificielles	s forte 105 106
1	1.2.1.2.Détermination de la séquence ou de la combinaison de séquences induisant la plu invalidation du gène <i>CFTR</i> 1.2.2. Stratégie d'édition du gène CFTR et endonucléases artificielles 1.2.2.1.Génotypage	s forte 105 106 106
1	 1.2.1.2.Détermination de la séquence ou de la combinaison de séquences induisant la plu invalidation du gène CFTR 1.2.2. Stratégie d'édition du gène CFTR et endonucléases artificielles 1.2.2.1.Génotypage 1.2.2.2.Validation des paires de TALE nucléases ciblant l'exon 2 du gène CFTR 	s forte 105 106 106 107
1	 1.2.1.2.Détermination de la séquence ou de la combinaison de séquences induisant la plu invalidation du gène CFTR 1.2.2. Stratégie d'édition du gène CFTR et endonucléases artificielles 1.2.2.1.Génotypage 1.2.2.2.Validation des paires de TALE nucléases ciblant l'exon 2 du gène CFTR 1.2.2.3.Sélection et validation de séquences sgRNA ciblant l'exon 2 du gène CFTR 	s forte 105 106 106 107 108
1 2.	 1.2.1.2.Détermination de la séquence ou de la combinaison de séquences induisant la plu invalidation du gène CFTR 1.2.2. Stratégie d'édition du gène CFTR et endonucléases artificielles 1.2.2.1.Génotypage 1.2.2.2.Validation des paires de TALE nucléases ciblant l'exon 2 du gène CFTR 1.2.2.3.Sélection et validation de séquences sgRNA ciblant l'exon 2 du gène CFTR CFTR INVALIDATION BY LENTIVIRAL VECTOR-MEDIATED RNA INTERFERENCE AND CRISPR-CAS9 GENO 	s forte 105 106 106 107 108 DME
1 2. ED	 1.2.1.2.Détermination de la séquence ou de la combinaison de séquences induisant la plu invalidation du gène CFTR 1.2.2. Stratégie d'édition du gène CFTR et endonucléases artificielles 1.2.2.1.Génotypage 1.2.2.2.Validation des paires de TALE nucléases ciblant l'exon 2 du gène CFTR 1.2.2.3.Sélection et validation de séquences sgRNA ciblant l'exon 2 du gène CFTR CFTR INVALIDATION BY LENTIVIRAL VECTOR-MEDIATED RNA INTERFERENCE AND CRISPR-CAS9 GENO 	s forte 105 106 106 107 108 DME 110
1 2. ЕD Ав	 1.2.1.2.Détermination de la séquence ou de la combinaison de séquences induisant la plu invalidation du gène CFTR 1.2.2. Stratégie d'édition du gène CFTR et endonucléases artificielles 1.2.2.1.Génotypage 1.2.2.2.Validation des paires de TALE nucléases ciblant l'exon 2 du gène CFTR 1.2.2.3.Sélection et validation de séquences sgRNA ciblant l'exon 2 du gène CFTR CFTR INVALIDATION BY LENTIVIRAL VECTOR-MEDIATED RNA INTERFERENCE AND CRISPR-CAS9 GENO DITING IN HUMAN AIRWAY EPITHELIAL CELLS 	s forte 105 106 106 107 108 DME 112

Materials and Methods	115
RESULTS	121
Discussion	126
Conclusion	129
References	131
FIGURES	135
SUPPLEMENTARY MATERIALS	144
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES1	<u>147</u>
BIBLIOGRAPHIE	160
ANNEXES	<u>178</u>
ANNEXE 1 : PSEUDOMONAS AERUGINOSA-INDUCED APOPTOSIS IN AIRWAY EPITHELIAL CELLS IS MEDIATED BY GAP	
JUNCTIONAL COMMUNICATION IN A JNK-DEPENDENT MANNER	179
ANNEXE 2 : Cx26 REGULATES PROLIFERATION OF REPAIRING BASAL AIRWAY EPITHELIAL CELLS	188

LISTE DES ABREVIATIONS

Α	аа	Acide aminé
	AAV	Adeno-associated virus
	ABC	ATP-binding cassette
	ABCD	Atrésie bilatérale des canaux déférents
	AMPc	AMP cyclique
	AP-1	Activator protein 1
	ARNds	ARN double brin
	ARNi	ARN interférent
	ARNm	ARN messager
	ARNnc	ARN non-codant
В	Всс	Burkholderia cepacia complex
	BCFTR	Basolateral CFTR-like channel
	BHK	Baby hamster kidney
	BIRC	Basolateral inwardly rectifying Cl- channel
	BORC	Basolateral outwardly rectifying Cl- channel
С	Ca2+	Calcium
	CaCC	Ca2+-activated Cl- channel
	Cas	CRISPR associated
	CDB	Cassure double brin
	CF	Cystic fibrosis
	CFTR	CF transmembrane conductance regulator
	Cl-	Chlore
	CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
D	Da	Dalton
	DDP	Différence de potentiel
Е	ENaC	Epithelial Na+ channel
	EROR	Endoplasmic reticulum overload response
G	GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
	GMPc	GMP cyclique
	GSH	Glutathion
н	hCFTR	CFTR humain
	HCO3-	Bicarbonate
	hES	Cellule souche embryonnaire humaine
	hiPS	Cellule souche pluripotente induite humaine
	HIV	Human immunodeficiency virus
	hTERT	human telomerase reverse transcriptase
I	IDLV	Integrase-deficient lentiviral vector
	IFN-γ	Interféron gamma
	IL	Interleukine
	ITR	Inverted terminal repeat
К	K+	Potassium
	К2Р	Double pore K+ channel
	Кса	Ca2+-activated K+ channel

	KIR	Inwardly rectifying K+ channel
	KV	Voltage-dependant K+ channel
L	LPS	Lipopolysaccharide
	LTR	Long terminal repeat
Μ	МАРК	Mitogen-activated protein kinase
	MEC	Matrice extra-cellulaire
	miRNA	microRNA
	MMP	Métalloprotéase matricielle
	MN	Méganucléase
Ν	Na+	Sodium
	NBD	Nucleotide-binding domain
	ΝϜκΒ	nuclear factor-kappa B
	NHEJ	Non-homologous end joining
0	ORCC	Outwardly rectifying Cl- channel
Ρ	P.a	Pseudomonas aeruginosa
	pb	Paire de bases
	pCFTR	CFTR porcin
	piRNA	PIWI-interacting RNA
	РК	Protéine kinase
	PMN	Polynucléaire neutrophile
	PPT	Polypurine tract
	pRB	Protéine du rétinoblastome
R	RE	Réticulum endoplasmique
	RGN	RNA-guided nuclease
	RH	Recombinaison homologue
	RISC	RNA-induced silencing complex
	RVD	Repeat variable diresidue
S	SCN-	Thiocyanate
	sgRNA	single-guide RNA
	shRNA	Short-hairpin RNA
	siRNA	Small interfering RNA
	SNP	Single nucleotide polymorphism
	SV40-LT	Antigène T du virus simien 40
Т	TALE	Transcription activator-like effector
	TLR	Toll-like receptor
	TMD	Transmembrane domain
<u> </u>	INF-α	lumor necrosis factor alpha
<u>U</u>	UPR	Unfolded protein response
V	vi-miRNA	miRNA viral
	VSOR	Volume-sensitive ORCC
	VSV-G	Vesicular stomatitis virus G glycoprotein
<u>w</u>	WPRE	Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element
Z	ZFN	Zing tinger nuclease
	ZFP	Zing finger protein

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURE 1 : CLASSIFICATION DES MUTATIONS ASSOCIEES A LA MUCOVISCIDOSE ET EXEMPLES.	12
FIGURE 2 : DETERMINANTS PHENOTYPIQUES DE LA MUCOVISCIDOSE.	
FIGURE 3 : PREVALENCE DE LA MUCOVISCIDOSE A L'ECHELLE NATIONALE	
FIGURE 4 : MANIFESTATIONS CLINIQUES ASSOCIEES AU DEFAUT DU GENE CFTR ET CORRELATION AVEC L'ACTIVITE DE LA PRO	OTEINE. 15
FIGURE 5 : SCHEMA ANATOMIQUE DES VOIES AERIENNES SUPERIEURES ET INFERIEURES.	
FIGURE 6 : COMPOSITION DES EPITHELIUMS RESPIRATOIRES LE LONG DE L'ARBRE BRONCHIQUE.	19
FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PROTEINE TRANSMEMBRANAIRE CFTR.	23
FIGURE 8 : SCHEMA FONCTIONNEL DES CYCLES SUCCESSIFS D'OUVERTURE ET DE FERMETEURE DU CANAL CFTR ATP-DEPEN	DANT 24
FIGURE 9 : VOIES D'ACTIVATION DES INTERFERONS A/B ET DES CYTOKINES/CHIMIOKINES PAR LA RECONNAISSANCE DES MOT	rifs de <i>P.</i>
AERUGINOSA PAR LES RECEPTEURS TOLL-LIKE	
FIGURE 10 : ROLES POTENTIELS DU CANAL CFTR DANS LA MIGRATION ET LA PROLIFERATION CELLULAIRE LORS DE LA REPAR	ATION DES
EPITHELIUMS PULMONAIRES.	
FIGURE 11 : VOIE DE BIOSYNTHESE DES MIRNA, SIRNA ET SHRNA.	68
FIGURE 12 : VOIES DE LA REPRESSION DE L'EXPRESSION GENIQUE MEDIEE PAR L'INTERFERENCE ARN.	
FIGURE 13 : MODALITES DE MODIFICATION CIBLEE DU GENOME A L'AIDE D'ENDONUCLEASES ARTIFICIELLES.	73
FIGURE 14 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE PAIRE DE ZFNS.	75
FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE PAIRE DE TALE NUCLEASES.	77
FIGURE 16 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU COMPLEXE CRISPR-CAS9.	
FIGURE 17 : MECANISMES DE REPARATION D'UNE CASSURE DOUBLE BRIN PAR LA VOIE DE LA LIGATION DES EXTREMITES NON HOMOI	LOGUES 83
FIGURE 18 : MECANISMES DE REPARATION D'UNE CASSURE DOUBLE BRIN PAR LA VOIE DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGU	e 84
Figure 19 : Genome viral du VIH-1 sauvage	89
FIGURE 20 : VECTEUR LENTIVIRAL DERIVE DU VIH-1 <i>SIN</i> DE 2 ^{NDE} GENERATION UTILISE DANS CE PROJET	
FIGURE 21 : INVALIDATION DU GENE CFTR PAR DES SEQUENCES SIRNA SPECIFIQUES.	104
FIGURE 22 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CONSTRUCTION SHRNA TRIPLE.	104
FIGURE 23 : INVALIDATION DU GENE CFTR PAR DES SEQUENCES SHRNA SPECIFIQUES.	105
FIGURE 24 : ALIGNEMENTS DE SEQUENCES ENCADRANT L'EXON 2 DU GENE CFTR AVEC LA SEQUENCE CONSENSUS DISPONI	BLE DANS LA
BASE DE DONNEES NCBI	106
FIGURE 25 : FREQUENCE DE MODIFICATION DES PAIRES DE TALE NUCLEASES CIBLANT L'EXON 2 DU GENE CFTR.	107
FIGURE 26 : FREQUENCE DE MODIFICATION DES SEQUENCES SGRNA TSJB1 ET TSJB2 CIBLANT L'EXON 2 DU GENE CFTR.	109
FIGURE 27 : EPITHELIUM PRIMAIRE DIFFERENCIE MODIFIE PAR TRANSDUCTION AVEC DES VECTEURS LENTIVIRAUX EXPRIMAN	IT DES
SEQUENCES SHRNA CFTR-SPECIFIQUES EN MICROSCOPIE CONFOCALE.	151

TABLEAU 1 : CARACTERISTIQUES DES PRINCIPALES LIGNEES CELLULAIRES IMMORTALISEES UTILISEES DANS LA RECHERCHE SUR LA	
MUCOVISCIDOSE	. 46
TABLEAU 2 : MODELES MURINS DE LA MUCOVISCIDOSE ET LEURS CARACTERISTIQUES	. 55
TABLEAU 3 : CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DES NUCLEASES ZF, TALE ET CRISPR-CAS9.	. 81
TABLEAU 4 : PROPRIETES ET CARACTERISTIQUES DES VECTEURS VIRAUX UTILISES DANS LE CADRE DU TRANSFERT DE GENE	. 88
TABLEAU 5 : RESULTATS DE LA RECHERCHE DE SEQUENCES SIRNA CIBLANT L'ARNM CFTR.	103
TABLEAU 6 : RESULTATS DE LA RECHERCHE DE SEQUENCES SGRNA CIBLANT L'EXON 2 DU GENE CFTR.	108

INTRODUCTION GENERALE

1. Présentation générale de la mucoviscidose

1.1. Un peu d'Histoire...

Plusieurs équipes ont tenté de déterminer l'origine génétique de la mucoviscidose et situent l'apparition des premières mutations à une période prénéolithique estimée entre 11 000 et 34 000 ans¹ et plus de 52 000 ans². Les premières références à la maladie qui était alors connue sous le nom de « maladie du baiser salé », apparaissent dès le Moyen Age. Cependant, il faut attendre le début du XX^{ème} siècle pour trouver les premières observations associant des atteintes pulmonaires mais surtout pancréatiques et digestives chez plusieurs membres d'une même famille. On parle alors de maladie cœliaque.

La fibrose kystique du pancréas fut décrite pour la première fois en 1936 par le pédiatre Guido Fanconi³ et reconnue comme pathologie à part entière deux ans plus tard grâce aux travaux de Dorothy H. Andersen⁴. Le terme « mucoviscidosis » quant à lui apparaît dans la littérature en 1943 sous l'impulsion du docteur Sydney Farber qui émet l'hypothèse que la maladie n'est pas uniquement localisée au niveau du pancréas mais serait plutôt due à une diffusion généralisée de mucus visqueux⁵. Cette description est complétée dix ans plus tard par l'observation d'anomalies électrolytiques dans la sueur par le docteur Paul Di Sant Agnese⁶. Cette découverte permet le développement⁷ puis la standardisation^{8,9} du test de la sueur, premier diagnostic ne se basant plus uniquement sur des signes cliniques. Le lien entre la sécrétion anormale de mucus et ces anomalies électrolytiques est établi au cours des années 1980 grâce aux recherches de Knowles¹⁰ et de Quinton¹¹ qui expliquent l'atteinte des poumons, du pancréas et des glandes sudoripares par un défaut électrolytique généralisé et non plus par le mucus lui-même. Ceci constitue une étape majeure dans la compréhension de la pathologie. C'est également au cours de cette décennie et grâce au développement des nouvelles techniques de génétique que le gène CFTR est localisé sur le bras long du chromosome 7 en 1985¹² puis isolé par les équipes de Lap-Chi Tsui, Collins et Riordan^{13–15} en 1989. Des expériences de mutagénèse dirigée confirment par la suite la nature de ce canal chlore AMPc-dépendant¹⁶.

Depuis, la connaissance de la pathologie a bénéficié de nombreux progrès techniques et scientifiques. Les fonctions du canal CFTR et ses interactions ont été précisées. Pourtant certains mécanismes restent encore peu connus ou peu compris. Aujourd'hui, il n'existe toujours pas de traitement permettant de soigner la mucoviscidose.

1.2. Etiologie

1.2.1. Localisation et structure du gène CFTR

La mucoviscidose (CF (*cystic fibrosis*), OMIM #219700) est causée par la présence de mutations sur chacune des deux copies du gène *CFTR* (*CF Transmembrane conductance Regulator*, gène ID 1080). Il est localisé sur le bras long du chromosome 7 au locus 7q31.2 et a été cloné et caractérisé en 1989^{13–15} grâce à une technique innovante dite de clonage positionnel. Cette technique repose sur le *chromosome walking* et le *chromosome jumping*. Le *chromosome jumping* est particulièrement utile pour les régions difficilement clonables (par exemple les séquences répétées) et consiste à digérer un ADN d'intérêt, à le circulariser puis à l'intégrer dans un phage. Une sonde est ensuite designée à partir d'une séquence connue et permet des sauts de 100-300 kpb. Deux marqueurs encadrant le gène de la mucoviscidose ayant été identifiés préalablement (MET et D₇S8), cette technique a permis de se rapprocher au plus près du gène d'intérêt. Le *chromosome walking* consiste à séquencer successivement des petits fragments d'ADN en partant de l'extrémité de la région identifiée du chromosome d'intérêt. Le clonage du gène *CFTR* fut le premier réalisé pour lequel la fonction et le produit du gène étudié n'étaient pas connus.

Le gène *CFTR* est constitué de 257 188 paires de base (pb) et contient 27 exons. Sa transcription génère un ARN messager (ARNm) de 6 132 pb codant une protéine de 1 480 acides aminés (aa). La protéine CFTR est un membre de la famille des « *ATP-Binding Cassette* » (ABC-C7) dont la fonction principale est le transport des ions chlore (Cl⁻) et bicarbonate (HCO₃⁻).

1.2.2. Classification des mutations du gène CFTR

A ce jour, 1 976 mutations ont été identifiées¹⁷. Une liste de l'ensemble des mutations décrites et de leur détermination est disponible sur le site du projet CFTR2 (http://www.cftr2.org/mutations history.php)¹⁸.

La mutation la plus fréquente correspond à la délétion de 3 pb correspondant à l'acide aminé phénylalanine en position 508 de la protéine normale (F508del)¹⁵. Elle concerne

environ 66% de tous les chromosomes CF. Une étude de 1990 portant sur 124 patients a confirmé ce chiffre à l'échelle de la population française (48% d'homozygotes et 38% d'hétérozygotes)¹⁹. Le tiers restant des mutations associées à la mucoviscidose présente une très grande hétérogénéité : seules quatre mutations autres que F508del ont des fréquences supérieures à 1% (G542X : 2.4%, G551D : 1.6%, N1303K : 1.3% et W1282X : 1.2%)^{20,21}.

Les mutations associées à la mucoviscidose sont réparties en 6 classes selon le défaut moléculaire qu'elles présentent et les conséquences fonctionnelles qu'elles engendrent pour la protéine CFTR²² (Figure 1) :

- <u>Classe I</u> : défaut de synthèse protéique > absence de protéine à la membrane apicale.
- <u>Classe II</u> : défaut de maturation et d'adressage > absence de protéine à la membrane apicale.
- <u>Classe III</u>: défaut de régulation du canal CFTR > niveau normal de protéines non fonctionnelles à la membrane apicale.
- <u>Classe IV</u> : altération de la conductance du canal CFTR > niveau normal de protéines à la membrane apicale avec une fonction résiduelle.
- <u>Classe V</u>: altération de la synthèse et de l'adressage > expression de protéines fonctionnelles à la membrane apicale réduite.
- <u>Classe VI</u>: altération de la stabilité du canal CFTR > protéines fonctionnelles mais instables à la membrane apicale.



Figure 1 : Classification des mutations associées à la mucoviscidose et exemples²³.

Les conséquences phénotypiques sont modérées pour les mutations des classes III à V, plus sérieuses pour les mutations de la classe IV et sévères pour les mutations des classes I et II. Cependant, il existe une très grande hétérogénéité des manifestations cliniques observées chez les patients mucoviscidosiques (CF), y compris chez des patients présentant les mêmes mutations.

1.2.3. Corrélations génotype-phénotype et existence de gènes modificateurs

De nombreuses études cherchant à établir une corrélation entre génotype et phénotype ont montré que si la nature des mutations CF est un bon indicateur de la fonction pancréatique exocrine, il existe au contraire une très faible corrélation pour l'atteinte respiratoire^{22,24,25}. D'autres déterminants jouent donc un rôle considérable, qu'il soit positif ou négatif au regard du phénotype (Figure 2). L'étude de leur contribution chez des patients issus d'une même fratrie ou chez des jumeaux mono ou dizygotes a permis de mettre en évidence l'importance des facteurs non génétiques ainsi que l'existence de gènes modificateurs et de variations au sein du génome (il en existerait plus de 3 millions). Les mécanismes d'action de ces cibles thérapeutiques potentielles ainsi que les interactions moléculaires associées font l'objet d'une attention particulière^{24–27}. Un tableau récapitulatif de ces gènes et de leurs caractéristiques est disponible dans l'article publié par Gallati *et al*²⁵.



Figure 2 : Déterminants phénotypiques de la mucoviscidose²⁶.

1.3. Epidémiologie

La mucoviscidose est la maladie génétique héréditaire mettant en jeu le pronostic vital des patients la plus fréquente dans les populations europoïdes pour lesquelles elle atteint en moyenne 1 naissance sur $3\ 000^{28,29}$. La fréquence des hétérozygotes, les porteurs sains, y est de $1/25^{30}$.

Il existe de grandes disparités à l'échelle mondiale et régionale. Si la prévalence de la mucoviscidose est la plus élevée en Europe, en Amérique du Nord et en Australie, elle est moins fréquente dans les populations d'Amérique latine $(1 / 4 000 - 10 000)^{29}$ et du Moyen-Orient (1 / 2 600 – 15 900). L'incidence est la plus faible en Asie et en Afrique mais la très faible collecte des données ne permet pas de connaître les taux précis dans ces régions et les estimations restent largement sous-évaluées³¹.

En France, le Registre Français de la Mucoviscidose 2012³² fait état de 6 196 patients recensés âgés de 0 à 86 ans avec une répartition égale entre les enfants et les adultes, et les hommes et les femmes. De même qu'au niveau mondial, la prévalence de la mucoviscidose connait une grande variabilité en France (Figure 3). Elle est estimée à 9.5/100°000 habitants.



<u>Figure 3</u> : Prévalence de la mucoviscidose à l'échelle nationale. (nombre de patients pour 100 000 habitants)³²

Ce rapport permet également de mesurer les progrès réalisés au cours des 20 premières années de suivi de la population des patients en France. En effet, l'âge médian au diagnostic était de 7 mois en 1992 contre 3 mois en 2012. L'espérance de vie a quant à elle progressé de 29 ans à 50 ans en deux décennies. Ces avancées s'expliquent notamment par la mise en place du dépistage néonatal systématique en France en 2002^{33–35} et une meilleure prise en charge.

1.4. Manifestations cliniques associées au défaut du gène CFTR

1.4.1. Atteintes liées à la mucoviscidose

La mucoviscidose affecte les transports ioniques et hydriques au niveau des épithéliums glandulaires de l'organisme causant une augmentation de la viscosité du mucus et une obstruction de nombreuses voies de sécrétion. L'atteinte est multiviscérale. Le tableau clinique et sa sévérité dépendent du fonctionnement qualitatif et quantitatif de la protéine CFTR (Figure 4) et varient selon les tissus, le stade de développement de la maladie, les mutations et les facteurs génétiques et environnementaux. La forme clinique la plus fréquente associe des troubles digestifs et respiratoires.





L'atteinte pulmonaire reste la cause majeure de morbidité et de mortalité chez les patients³⁷ et se traduit par une inflammation délétère et une surinfection bactérienne chronique des voies respiratoires (cf. 2.3.2 et 2.3.3). Des études ont montré que les poumons des nouveaunés sont normaux ou quasi normaux sans signe d'infection bactérienne³⁸. Celle-ci se développe ensuite progressivement avec une colonisation initiale par *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae*. A un stade plus avancé de la maladie, ces microorganismes régressent et l'infection à *Pseudomonas aeruginosa (P.a*) progresse constituant un tournant négatif dans la pathologie qui se manifeste par une accélération de l'atteinte pulmonaire³⁸. La dégradation du tissu pulmonaire aboutit à une insuffisance respiratoire chronique majeure.

L'atteinte digestive est caractérisée par une insuffisance pancréatique exocrine chez 85-90% des patients CF présentant une mutation sévère sur les deux allèles du gène *CFTR*. L'obstruction des canaux pancréatiques se traduit par une sécrétion défectueuse ou absente des enzymes du pancréas et conduit à un défaut d'absorption des acides gras essentiels et des protéines et vitamines liposolubles (A, D, E et parfois B12) responsable du retard de croissance staturopondérale notamment. Un diabète secondaire à l'atteinte pancréatique est observé chez environ 20-40% des adolescents et des adultes. Ce diabète de type insulinodépendant³⁹ a un impact négatif sur la fonction pulmonaire et la survie des patients. Les troubles liés à l'atteinte hépatobiliaire sont également fréquents et multiples et peuvent évoluer vers une cirrhose biliaire dans 10-15% des cas. Les conséquences sont les mêmes que chez les sujets sains et peuvent conduire à la greffe hépatique. Les hépatopathies sont la deuxième cause de décès chez les patients CF après les troubles respiratoires³⁷.

D'autres manifestations complètent le tableau clinique des patients CF, notamment des troubles de la reproduction (l'infertilité due à une atrésie bilatérale des canaux déférents (ABCD) concerne plus de 95% des patients masculins), des troubles cardiaques, des atteintes ostéo-articulaires ou encore des atteintes ORL (sinusite maxillaire, polypose nasale).

La prise en charge thérapeutique des patients se limite encore à la gestion des symptômes et des troubles associés. Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible. Un suivi médical rigoureux est essentiel pour le maintien de l'état de santé des patients. La prise en

charge est multidisciplinaire, et bien qu'en constante amélioration, elle reste lourde et contraignante (1-2 heures en période normale et jusqu'à 5-6 heures en période de surinfection). Elle répond à plusieurs objectifs⁴⁰ : la prévention, la détection et le traitement précoce des troubles associés, le maintien d'une fonction respiratoire et d'un état nutritionnel optimal ainsi que le maintien de la qualité de vie du patient et de sa famille.

1.4.2. Les CFTR-opathies

La mucoviscidose reste encore aujourd'hui un diagnostic clinique. Si la plupart des patients atteints sont facilement identifiés, il existe un nombre restreint de cas pour lesquels la réponse est ambiguë et qui ne sont pas diagnostiqués avant l'adolescence⁴¹.

En 2007 et 2008, l'*EuroCareCF working group* a réuni 35 experts afin de proposer une définition consensus des troubles liés cliniquement ou génétiquement au défaut du gène *CFTR* ou « CFTR-related disorders » (CFTR-RDs)⁴². Un CFTR-RD est défini comme une entité clinique associée à un dysfonctionnement du gène *CFTR* qui ne répond pas à l'ensemble des critères de diagnostic de la mucoviscidose. Trois manifestations cliniques illustrent ces troubles :

- l'ABCD congénitale ou isolée représente 3% des cas d'infertilité chez les hommes. Elle est causée par des mutations des deux allèles du *CFTR* dans 70-90% cas (1 mutation sévère + 1 mutation modérée ou bien 2 mutations modérées).
- la pancréatite chronique idiopathique est causée dans 30% des cas par des mutations associées à la mucoviscidose. Il n'existe pas de mutations spécifiques associées mais elles sont le plus souvent issues des classes IV et V (cf. 1.2.2).
- les bronchectasies disséminées correspondent à une détérioration des tissus pulmonaires conséquente à une dilatation anormale et irréversible des bronches de petit et moyen calibres. Dans un cas sur deux, elles sont associées à d'autres pathologies dont la mucoviscidose.

La grande variabilité des phénotypes CF et l'existence de ces pathologies associées démontrent l'importance de la mise au point de modèles CF reproduisant cette hétérogénéité pour la compréhension des interactions moléculaires et cellulaires et la mise au point de thérapies adaptées.

2. Rôle du CFTR dans l'atteinte pulmonaire liée à la mucoviscidose

2.1. Organisation des épithéliums respiratoires

2.1.1. Anatomie de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire a pour fonction principale d'assurer les échanges gazeux entre l'air oxygéné et le sang riche en dioxyde de carbone. Il joue également un rôle de protection de l'organisme contre les corps étrangers et les agents pathogènes externes. On distingue les voies aériennes supérieures et les voies aériennes inférieures (Figure 5).



Figure 5 : Schéma anatomique des voies aériennes supérieures et inférieures⁴³.

Les voies aériennes supérieures sont constituées des fosses nasales, des sinus et du pharynx. Elles sont responsables de la filtration, de l'humidification et de l'ajustement de la température de l'air inspiré. Les voies aériennes inférieures sont constituées des voies extrapulmonaires, des poumons et de l'interstitium. Les voies extra-pulmonaires comprennent le larynx, la trachée et les bronches souches. Les poumons comprennent les bronches lobaires, les bronches segmentaires, les bronchioles et les alvéoles pulmonaires. L'interstitium correspond aux voies sanguines et lymphatiques. Du point de vue histologique, les voies aériennes sont revêtues d'un épithélium respiratoire soutenu par le chorion conjonctivo-élastique dans lequel on peut trouver des glandes exocrines. Selon la localisation, du cartilage et des tissus musculaires sont aussi présents.

2.1.2. Les épithéliums respiratoires

Il existe différents types d'épithéliums respiratoires dont l'organisation et la composition cellulaire varient en fonction de la localisation au sein des voies aériennes (Figure 6).



Figure 6 : Composition des épithéliums respiratoires le long de l'arbre bronchique⁴⁴.

2.1.2.1.L'épithélium malpighien

Il s'agit d'un épithélium pavimenteux pluristratifié comportant plusieurs assises cellulaires. Il peut être kératinisé (zone externe des fosses nasales) ou non et se situe au niveau du vestibule des fosses nasales, de l'oropharynx, du laryngopharynx et dans certaines parties du larynx.

2.1.2.2.L'épithélium pseudo-stratifié cilié

L'épithélium pseudo-stratifié cilié est présent au niveau des zones olfactives et respiratoires des fosses nasales, des sinus, du nasopharynx, du larynx, de la trachée et des bronches. Il est composé de 4 types cellulaires : les cellules basales, les cellules ciliées, les cellules

caliciformes à mucus et les cellules endocrines (Figure 6). Il est associé à des glandes séromuqueuses qui sont particulièrement abondantes au niveau de la trachée. La composition et l'épaisseur de cet épithélium varient de manière progressive vers les bronchioles. Il est recouvert d'un liquide de surface composé d'une couche de mucus reposant sur une couche de liquide periciliaire facilitant la clairance mucociliaire.

Les cellules basales constituent 6-30% de l'épithélium respiratoire selon la localisation et sont présentes depuis la trachée jusqu'aux bronchioles terminales. Ce sont des cellules souches multipotentes qui assurent l'homéostasie et le remodelage de l'épithélium. L'expression abondante de protéines du cytosquelette, jonctionnelles et adhésives permet leur ancrage à la lame basale ainsi que l'attachement des cellules plus superficielles de l'épithélium^{45,46}.

Les cellules ciliées représentent environ 50% des cellules et sont donc le type cellulaire le plus abondant de l'épithélium respiratoire pseudostratifié cilié. Elles possèdent des cils mobiles (100-300 par cellule) situés au pôle apical dont les battements coordonnés permettent l'évacuation du mucus et des particules qu'il contient^{46,47}.

Les cellules caliciformes à mucus sécrètent environ 10% du mucus trachéo-bronchial. Elles sécrètent majoritairement les mucines MUC5AC et de manière plus réduite, les mucines MUC5B^{48,49}. Le mucus permet de lubrifier la surface apicale de l'épithélium respiratoire et d'emprisonner les agents pathogènes extérieurs et peut également absorber certains gaz nocifs comme l'ozone. Sa production et sa viscoélasticité doivent être finement régulées. Les cellules caliciformes sont particulièrement abondantes au niveau de la trachée (jusqu'à 6 800 cellules/mm² d'épithélium)^{46,47} puis leur nombre diminue progressivement.

Les cellules endocrines ont un rôle intermédiaire de sécrétion d'hormones et de cellules nerveuses chémoréceptrices. Elles participent à la contraction et au relâchement des muscles entourant les bronches afin de faciliter la conduction.

Les glandes acineuses séro-muqueuses sécrètent environ 90% du mucus trachéo-bronchial. Elles sont constituées de cellules à mucus et de cellules séreuses. Les premières sécrètent des mucines MUC5B, tandis que les secondes sécrètent des mucines MUC7 et produisent des sécrétions plus aqueuses qui permettent l'hydratation du mucus^{48,49}. Le nombre de ces glandes diminue avec le diamètre des voies respiratoires.

2.1.2.3.L'épithélium cuboïdal

L'épithélium cuboïdal est pseudo-stratifié et cilié dans les bronchioles et évolue vers un épithélium cuboïdal simple dans les bronchioles respiratoires. Le nombre de cellules basales, ciliées et caliciformes à mucus ainsi que le nombre de glandes séro-muqueuses diminuent jusqu'à être absentes tandis que les cellules de Clara sont de plus en plus présentes (Figure 6). Ces dernières sont non-ciliées et forment un dôme apical bombé. Ce sont des cellules multifonctionnelles sécrétrices de protéines (notamment des mucines) et de peptides antimicrobiens. Elles assurent également le rôle de cellules progénitrices permettant la régénération des cellules ciliées en l'absence des cellules basales⁴⁷.

2.1.2.4. L'épithélium alvéolaire

L'épithélium alvéolaire est présent dans la zone d'échange gazeux au niveau des conduits et sacs alvéolaires. Cet épithélium pavimenteux simple est composé des pneumocytes alvéolaires de types I et II (Figure 6).

Les pneumocytes de type I (ATI) sont des cellules allongées qui représentent un tiers des cellules alvéolaires mais constituent 95% de la surface alvéolaire. Les fonctions associées à ces cellules plates sont encore discutées. Les cellules ATI assurent le transport d'ions et de macromolécules entre le sac alvéolaire et l'espace septal ainsi que les échanges gazeux. Ces cellules possèdent en outre la perméabilité à l'eau la plus élevée de tous les types cellulaires chez les Mammifères⁵⁰.

Les pneumocytes de type II (ATII) sont plus nombreux mais constituent les 5% restants de l'épithélium alvéolaire. Ce sont des cellules globuleuses possédant des microvillosités au pôle apical synthétisant, sécrétant et recyclant les composants du surfactant, un composé tensio-actif réduisant les tensions de surface et permettant le maintien des cavités alvéolaires. Les cellules ATII participent également à la défense immunitaire de l'épithélium alvéolaire grâce à la production de signaux stimulateurs des lymphocytes T, à l'expression de récepteurs *Toll-like* ou à la production de composés chémoattractants. Enfin, ces cellules possèdent la capacité de se multiplier et de se différencier en pneumocytes de type I permettant ainsi la régénération de l'épithélium alvéolaire⁵⁰.

2.2. Rôles du canal CFTR dans les transports transépithéliaux

L'épithélium respiratoire constitue une barrière physique entre la lumière des voies respiratoires et le compartiment interstitiel. Les mécanismes de sécrétion et d'absorption d'ions régulent la composition et la hauteur du liquide périciliaire et du fluide alvéolaire, et les flux hydriques ce qui permet une clairance mucociliaire optimale. Cette régulation fait essentiellement intervenir la sécrétion d'ions Cl⁻ et HCO₃⁻ et l'absorption d'ions sodium (Na⁺). Plusieurs études ont également démontré l'importance du transport des ions potassium (K⁺). Plus de 100 canaux, pompes, échangeurs ou co-transporteurs ont été identifiés à ce jour⁵¹.

2.2.1. CFTR : un canal chlore aux effets pléiotropiques

Le canal CFTR est une protéine appartenant à la famille des transporteurs ABC. Ces transporteurs assurent le passage unidirectionnel de différents types de molécules (acides aminés, sucres, drogues, protéines) à travers les membranes cellulaires grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP. Ainsi, ces protéines participent au transport des métabolites, à la transduction de signaux, à la sécrétion de protéines ou encore à la présentation d'antigènes. Elles possèdent une architecture commune comprenant douze domaines transmembranaires à hélices α (TMDs, *transmembrane domains*) et deux domaines de fixation à l'ATP (NBDs, *nucleotide-binding domains*) qui peuvent être arrangés de manière variable chez les eucaryotes mais qui sont généralement tous fusionnés en une chaine polypeptidique simple. La fixation de l'ATP se fait au niveau de deux séquences consensus appelées motifs Walker A et Walker B.

La protéine CFTR fait figure d'exception dans la famille des transporteurs ABC⁵². En effet, elle est le seul canal ionique identifié et comprend un domaine de régulation (domaine R) unique (Figure 7). Ses extrémités C-terminale et N-terminale sont également plus longues et permettent l'interaction avec d'autres protéines⁵³. Les NBDs ont une structure en feuillet classique et le passage des ions est assuré par un pore formé par les six hélices α transmembranaires de chacun des TMDs. Les chaines d'acides aminés chargés positivement y jouent un rôle prépondérant pour attirer les anions. En 2006, Linsdell⁵⁴ a émis l'hypothèse que plusieurs ions peuvent se fixer dans le pore du canal CFTR et que leurs effets répulsifs

mutuels accélèrent leur sortie. Le domaine R contient de nombreux résidus chargés ainsi que neuf séquences consensus pour la fixation des protéines kinases (PK) A, C et G^{52,53}.



Figure 7 : Représentation schématique de la protéine transmembranaire CFTR⁵⁵.

Le canal CFTR est le plus étudié des canaux Cl⁻ du fait de son rôle dans les atteintes liées à la mucoviscidose. Il est localisé principalement à la membrane apicale des cellules épithéliales ciliées et des cellules des glandes sous-muqueuses⁵⁶. Il assure le transport des anions essentiellement Cl⁻ et HCO₃^{- 16,57} et participe également au transport d'autres molécules comme les ions thiocyanate (SCN⁻)⁵⁸ et le gluthation (GSH)^{59,60}. Au niveau des épithéliums alvéolaires, le canal CFTR serait exprimé dans les cellules de types I et II et possèderait des fonctions d'absorption ou de sécrétion selon les études⁵⁰. Il est activé par différentes protéines kinases (PKA AMPc-dépendante, PKC Ca²⁺-dépendante, PKG GMPc-dépendante) ou par la stimulation des protéines G et nécessite la fixation et l'hydrolyse d'ATP^{50,51}.

Le canal CFTR existe sous trois états : fermé, ouvert et « prêt à l'ouverture » qui ne permet pas le passage des ions mais permet une transition plus rapide vers l'état ouvert (Figure 8). Au repos, le domaine R non-phosphorylé assure la fermeture du pore et a donc un rôle inhibiteur qui permet de maintenir la concentration d'ATP intracellulaire⁵². La phosphorylation du domaine R par les PKA ou après stimulation de la protéine G est indispensable à l'ouverture du canal. La phosphorylation par les PKC induit seulement une faible activation du CFTR mais pourrait aider à l'activation par les PKA⁶¹. La phosphorylation du domaine R induit un changement de conformation facilitant les interactions avec d'autres

domaines de la protéine ce qui augmenterait l'affinité de l'ATP pour les NBDs. La fixation d'ATP induit des changements de conformation au sein des TMDs permettant l'ouverture du canal, puis son hydrolyse déclenche la fermeture du pore⁵². Il semble que des différences entre les deux NBDs permettent l'hydrolyse d'une seule molécule d'ATP, tandis que la seconde n'est pas altérée ce qui permet plusieurs cycles d'ouverture/fermeture successifs⁶¹. L'activité du canal augmente de manière proportionnelle avec le degré de phosphorylation ^{62,63}.



<u>Figure 8</u> : Schéma fonctionnel des cycles successifs d'ouverture et de fermeteure du canal CFTR ATP-dépendant⁶¹. Le domaine R n'est pas représenté. Les états C₀ à C₂ correspondent à un état fermé. Les parenthèses en crochet correspondent à un état de transition.

En 2012, Edelman et Saussereau émettent l'hypothèse que le canal CFTR est une protéine d'ancrage (ou *hub*) qui interagirait avec différentes protéines et régulerait ainsi de nombreuses fonctions physiologiques⁶⁴. Son ancrage dans un réseau protéique permettrait son implication dans des fonctions comme la réponse inflammatoire, la réponse aux agents infectieux ou encore les transports ioniques transépithéliaux.

2.2.2. Transports transépithéliaux et rôles du canal CFTR

2.2.2.1.Les canaux et transporteurs ioniques

En plus de sa fonction de transporteur ionique, le canal CFTR intervient dans la régulation d'autres canaux et transporteurs de l'épithélium des voies respiratoires.

Les canaux chlore ORCCs (*outwardky rectifying chloride channels*) ont été les premiers identifiés comme interagissant avec le canal CFTR. L'ouverture du canal CFTR regulerait un mécanisme de transport de l'ATP dans le milieu extra-cellulaire, ce qui induirait l'activation des canaux ORCCs via un signal d'activation purinergique^{65,66}. Ces canaux sont localisés au pôle basolatéral des cellules épithéliales et activés par l'ATP et l'AMPc (uniquement pour les cellules non-CF)⁵¹. Le transport des ions Cl⁻ au pôle basolatéral participerait à la régulation de la sécrétion apicale⁵⁰.

Le canal CFTR aurait également un rôle inhibiteur des canaux Cl⁻ activés par le calcium (CaCCs, *calcium-activated chloride channels*). Localisés à la membrane apicale, ils possèdent de faibles capacités de discrimination entre les anions. Le canal TMEM16 (ou ANO1) appartient à la famille des CaCC et assure une faible proportion de ce type de courant. D'autres membres de cette famille ont été identifiés dans l'épithélium trachéal de souris mais leur contribution reste à préciser⁵⁰.

D'autres canaux permettent le transport des ions Cl⁻ à travers la barrière épithéliale, notamment les canaux Cl⁻ sensibles aux variations de volume cellulaire (VSOR, *volume sensitive outwardly rectifying chloride channel*) ou les canaux Cl⁻ voltage-dépendants de la famille du gène *CLC*. Cependant, Il n'existe pas d'interaction connue entre ces canaux et le canal CFTR^{50,51}.

Les canaux ENaCs (*epithelial sodium channels*) assurent le transport des ions Na⁺ au pôle apical des cellules épithéliales respiratoires. Ces canaux permettent l'absorption des ions Na⁺ et jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie hydrique de l'épithélium. Ce canal discrimine les cations en fonction de leur taille rendant le transport des ions K⁺ ou NH4⁺ impossible par exemple, mais autorisant la perméabilité aux ions Li⁺ et H⁺⁵¹. Bien que son influence (activateur/inhibiteur) et que les mécanismes d'action restent controversés, plusieurs études ont décrit un rôle du canal CFTR sur les canaux ENaCs^{67–69}.

Plus de 30 canaux potassiques ont été identifiés à ce jour mais les interactions avec le canal CFTR reste peu connues. Ces canaux sont répartis en 3 catégories en fonction du nombre de domaines transmembranaires qu'ils comportent⁵¹. Les canaux K⁺ voltage-dépendants (Kv) ou activés par le calcium (K_{Ca}) possèdent 6 domaines transmembranaires. Les premiers sont localisés au pôle basolatéral uniquement. Les canaux K_{2P} possèdent 4 domaines

transmembranaires formant deux pores et sont présents dans la membrane apicale des cellules épithéliales respiratoires. Leur ouverture est activée par les mouvements d'étirement ou de cisaillement de la membrane ou par une augmentation du volume cellulaire, des variations du potentiel de membrane ou des variations de pH intra-cellulaire. Enfin les canaux apicaux K_{IR} (*inwardly rectifying K⁺ channels*) possèdent deux domaines transmembranaires. Ces canaux potassiques participent à la régulation du potentiel de membrane et ainsi au maintien du gradient électrochimique permettant la sécrétion des ions Cl⁻. Un des canaux K_{ir}, le canal ROMK2, verrait sa sensibilité aux composés sulfonylurées augmentée par le canal CFTR⁷⁰. Cette régulation nécessite la présence du NBD1.

En plus des canaux, les transports ioniques sont également assurés par les transporteurs qui permettent un flux contre leur gradient de concentration. Il s'agit de pompes, de cotransporteurs ou d'échangeurs. Le canal CFTR serait impliqué dans la régulation de certains transporteurs, notamment l'échangeur apical Na⁺/H^{+ 71}, l'échangeur basolatéral Cl⁻/HCO₃^{- 72}, la pompe Na⁺/K⁺-ATPase localisée au pôle basolatéral des cellules épithéliales respiratoires, ou encore l'échanger Cl⁻/HCO₃^{- 73}.

2.2.2.1.Les hémicanaux connexines et pannexines

Les connexines sont des protéines transmembranaires des jonctions communicantes de type *gap*. L'assemblage de six connexines forme un hémicanal appelé connexon. L'assemblage de deux connexons de cellules adjacentes forme un pore qui permet l'échange inter-cellulaire d'ions et de différents métabolites cytoplasmiques. Les connexines contribuent à l'homéostasie et à la défense de l'hôte. Elles sont notamment impliquées dans la coordination des battements ciliaires, le relargage d'ATP dans le milieu extra-cellulaire qui permet ensuite l'activation de différents canaux, les transports hydriques transépithéliaux ou encore la coordination de la réponse immunitaire⁷⁴. Plusieurs études ont démontré l'existence d'interactions entre le canal CFTR et les connexines⁷⁵. Au niveau de l'épithélium respiratoire, plusieurs types de connexines sont exprimés, notamment la connexine 43. Des études ont montré que le canal CFTR possède un rôle régulateur de la communication par ces connexines impliquant la cytokine pro-inflammatoire TNF- α (*tumor necrosis factor \alpha*) et

qu'un défaut d'expression du CFTR est associé à un défaut de signalisation par la tyrosine kinase Src contribuant à une réponse inflammatoire excessive^{76,77}.

Les pannexines ne partagent pas d'homologie avec les connexines mais possèdent des similarités de structure et de fonction⁷⁸. Leur capacité à former des pores inter-cellulaires reste à démontrer. Ces protéines seraient impliquées dans le relargage d'ATP⁷⁹.

2.2.2.2.Les aquaporines

Les aquaporines sont des protéines formant un pore perméable aux molécules d'eau (H₂O) mais empêchant le passage des ions. Quatre types d'aquaporines sur les 11 existantes sont exprimés dans l'épithélium respiratoire au niveau apical et basolatéral⁵¹. Les aquaporines 1, 4 et 5 sont uniquement perméables à l'eau tandis que l'aquaporine 3 permet également le passage de petits solutés comme le glycérol. Cette dernière serait activée par le canal CFTR induisant ainsi une augmentation de la perméabilité à l'eau⁸⁰.

Dans l'épithélium alvéolaire, elles sont particulièrement exprimées dans les cellules ATI notamment l'aquaporine 5⁵⁰.

2.3. Conséquences du dysfonctionnement du CFTR sur les fonctions de l'épithélium respiratoire

2.3.1. Altération de la clairance mucociliaire

Afin de se protéger des pathogènes et stimuli extérieurs, l'organisme a mis en place des barrières physiques et chimiques spécialisées, notamment au niveau des épithéliums. Dans les poumons, l'une des premières lignes de défense est constituée par le liquide de surface des voies aériennes. Ce dernier comprend deux couches superposées : une couche de mucus (dite couche « gel ») reposant sur une couche aqueuse, le liquide periciliaire (dite couche « sol »)^{81,82}.

La couche de mucus contient environ 97% d'eau et 3% de phase solide (mucines et autres protéines, sels, lipides, débris cellulaires) en conditions normales. Les mucines sont des protéines extrêmement grandes (plusieurs milliers de kDa) qui se lient à des molécules d'eau pour former un gel. Dans les voies respiratoires, les mucines de type MUC5AC et MUC5B

forment des polymères homotypiques et sont sécrétées par les cellules caliciformes à mucus et les cellules à mucus des glandes sous-muqueuses. Une fois le réseau formé, la dilution de la phase gel n'est plus possible⁸¹. L'hydratation est donc cruciale pour la mise en place d'une couche de mucus présentant des propriétés viscoélastiques et rhéologiques adaptées à sa fonction. En effet, un mucus deshydraté voit sa viscosité augmenter, ce qui se traduit par une adhérence accrue aux parois des voies aériennes. La couche de mucus assure à la fois la fonction de barrière physique (bien que les pores puissent laisser passer les virus de petite taille) et permet également de séquestrer les pathogènes grâce à la présence des glycanes des mucines qui proposent des sites d'interaction, pour les évacuer hors des voies respiratoires.

La couche de liquide périciliaire hydrate les mucines et recouvre les cils présents à la surface apicale des cellules épithéliales respiratoires ciliées permettant ainsi leur battement et la mobilité de la couche de mucus vers les voies aériennes proximales. Sa hauteur (environ 7µm) est critique pour permettre une clairance mucociliaire efficace. Le volume du liquide de surface est régulé par la concentration des ions Na⁺ et Cl⁻. La présence de nucléotides qui agissent sur la sécrétion de ces derniers⁸¹.

Le liquide de surface des voies respiratoires contient également des substances antimicrobiennes, anti-oxydantes, anti-protéasiques, des molécules inflammatoires ainsi que des cellules phagocytaires qui participent à sa fonction de défense⁸².

Chez les patients CF, cette barrière est altérée. Le mucus est visqueux et la couche périciliaire est deshydratée et plus fine. Ceci conduit à un écrasement des cils et conséquemment à une réduction de la clairance mucociliaire constituant un environnement favorable pour les pathogènes. Les mécanismes liés au défaut de sécrétion des ions Cl⁻ par le canal CFTR muté et à l'altération de la clairance mucociliaire restent controversés⁸³. Une hypothèse largement partagée implique la régulation des canaux ENaCs par les canaux CFTR et l'absorption massive d'ions Na⁺ conduisant à une deshydratation du liquide de surface. Si cette hypothèse semble validée par différentes études, notamment celle décrivant un phénotype d'atteinte pulmonaire proche des patients CF chez un modèle murin surexprimant les canaux ENaCs, d'autres observations ont contesté cette hypothèse^{84–86}. Le pH a également été décrit comme participant à la modification des propriétés viscoélastiques du mucus. Des études conduites dans des modèles animaux CF ont montré que le pH est

anormal dans la couche de liquide de surface des voies respiratoires. Le CFTR étant impliqué dans la sécrétion des ions HCO₃⁻ et la régulation d'autres canaux et pompes (cf. 2.2.2), les mutations de ce gène contribueraient à la réduction du pH⁸². Une acidification du liquide de surface induirait une augmentation de la viscosité du mucus et réduirait l'activité des substances microbiennes, comme par exemple celle du peptide cationique LL-37. Les changements de propriétés du mucus conduiraient à l'emprisonnement du peptide et à sa rétention⁸². La diminution du pH serait enfin associée à la réduction de la capacité phagocytaire des macrophages alvéolaires, à l'augmentation de l'activité des caractéristique doit cependant être envisagée avec précaution car non partagée par l'ensemble des modèles CF, notamment le modèle porcin.

2.3.2. Infection bactérienne chronique et interactions hôte-pathogènes

Les voies aériennes inférieures sont peuplées d'une grande variété de bactéries aussi bien en conditions normales qu'en conditions pathologiques⁸⁷. La plupart de ces bactéries occupent des fonctions essentielles et sont non-pathogènes. Cependant, le microbiote peut être perturbé dans certaines pathologies. C'est le cas des patients CF qui présentent un microbiote particulier évoluant selon l'âge et le stade de la maladie.

L'altération de la clairance mucociliaire chez les patients CF fournit un environnement favorable à l'établissement de foyers infectieux. Si plusieurs pathogènes ont été identifiés, *P. aeruginosa* est associé à une dégradation progressive de la fonction pulmonaire et un pronostique négatif pour la survie des patients. La stimulation des cellules épithéliales et des cellules de l'immunité par les pathogènes, et notamment *P. aeruginosa*, intervient grâce à des récepteurs spécifiques, notamment les récepteurs *Toll-like* (TLRs). Ce sont des protéines transmembranaires (membranes cellulaires ou intra-cellulaires) localisées au niveau des cellules épithéliales et des cellules de l'immunité. Dans le contexte de la mucoviscidose, les TLRs les plus importants sont les TLRs-2, 4, 5, 9 et 10⁸⁸. La pathogénicité de *P. aeruginosa* est liée à différents composants⁸⁹. Le TLR-2 reconnait les lipoprotéines, les composants de la capsule extra-cellulaire ou encore la toxine sécrétée ExoS. Il requiert la présence d'un co-récepteur et fonctionne sous la forme d'hétérodimère avec les TLRs-1 ou 6. Le TLR-4

reconnait les lipopolysaccharides (LPS), certaines protéines de la membrane externe, la toxine ExoS et la capsule d'alginate. Le TLR-5 permet la fixation spécifique des flagellines, le composant principal du flagelle bactérien. Le TLR-9 fonctionne au niveau intra-cellulaire et reconnait les motifs CpG non méthylés de l'ADN bactérien. L'activation des TLRs suite à la reconnaissance de motifs spécifiques déclenche une série complexe de signaux de transduction initiée par le recrutemet d'une protéine adaptatrice qui détermine la voie de signalisation (Figure 9)⁸⁹. Tous les TLRs à l'exception du TLR-3 utilisent la protéine MyD88 comme adaptateur. Les TLRs-1, 2, 4 et 6 nécessitent le facteur TIRAP pour pouvoir recruter MyD88. Le recrutement de l'adaptateur MyD88 active la phosphorylation des protéines IRAK-1, IRAK-4, TRAF-6 et TAK-1. Ceci conduit à l'activation de la transcription des voies NF- κ B et AP-1 et à la production de cytokines et chimiokines inflammatoires. Les TLRs-3 et 4 peuvent également activer les voies NF- κ B et AP-1 grâce au recrutement de l'adaptateur TRIF. Cette protéine permet aussi l'activation de la voie des interférons α et β . Dans les macrophages, l'activation des TLRs intervient dans la phagocytose des pathogènes.



<u>Figure 9</u> : Voies d'activation des interférons α/β et des cytokines/chimiokines par la reconnaissance des motifs de *P. aeruginosa* par les récepteurs *Toll-like*⁸⁹.

Chez les patients CF, l'infection initiale est caractérisée par des souches planctoniques nonmucoïdes de *P. aeruginosa* qui peuvent pénétrer dans le mucus grâce à leur flagelle mobile. Ces souches ne présentent pas de résistance aux antibiotiques. L'infection évolue ensuite vers une phase chronique avec des souches mucoïdes produisant des alginates et se développant sous forme de biofilms. Dans cette configuration, *P. aeruginosa* est protégé de la phagocytose et présente une résistance aux antibiotiques. A ce stade, l'éradication des pathogènes est généralement impossible⁹⁰. La colonisation des voies respiratoires est due à plusieurs facteurs, certains directement liés à ce pathogène, d'autres au défaut du gène *CFTR*.

P. aeruginosa possède de grandes capacités d'adpatation, notamment grâce à un profil mutationnel hypervariable. L'adaptation concerne l'environnement particulier des voies respiratoires dans un contexte CF. Le passage d'un phénotype planctonique à un phénotype mucoïde se traduit par une diminution des facteurs de virulence, une perte de mobilité et une sécrétion d'exopolysaccharides. Ceci permet aux pathogènes d'échapper à la phagocytose^{91,92}. Certains facteurs de virulence peuvent également inhiber la phagocytose d'un point de vue fonctionnel, par exemple l'élastase bactérienne LasB qui clive certains récepteurs et diminue le recrutement phagocytaire⁹². *P. aeruginosa* possède également des capacités d'adaptation à un environnement pauvre en oxygène et en fer. L'adpatation au manque de fer se traduit par une expression accrue de sidérophores ou à l'utilisation de sidérophores exogènes. Bien que l'hôte sécrète des protéines fixant ces molécules, l'expression par *P. aeruginosa* devient trop importante pour être contenue⁹¹.

Concernant la composante CFTR-spécifique des interactions hôte-pathogènes dans la mucoviscidose, le défaut du gène *CFTR* se manifesterait à travers quatre fonctions clés : l'altération du micro-environnement pulmonaire (favorisant l'installation de *P. aeruginosa*), une augmentation de la permissivité à l'infection, une dérégulation des mécanismes de défense et une altération de la reconnaissance des pathogènes⁸³. Des études ont montré des différences d'expression de certains TLRs, notamment une diminution de celle du TLR4^{88,93}. Blohmke *et al.*⁹⁴ ont également montré que la présence d'un codon stop prépaturé dans la séquence du gène *TLR5* est associée à une réponse plus faible à la flagelline. Les patients adultes CF possédant ce codon stop prématuré associé au polymorphisme *rs5744168* présentent une meilleure fonction pulmonaire ainsi qu'un meilleur indice de masse corporelle confirmant le statut de gène modificateur du *TLR5*. Les résultats concernant l'expression des TLRs restent cependant contradictoires et dépendent du modèle d'étude et

de la localisation. D'autres études suggèrent plutôt une altération de leur localisation⁹³. Plusieurs hypothèses sur le rôle direct du CFTR ont également été proposées. Le canal pourrait agir comme co-récepteur du TLR-4 et serait ainsi impliqué dans la reconnaissance de *P. aeruginosa* et de son internalisation pour être dégradé^{90,91}. Les mutations du gène *CFTR* seraient associées à une altération de la composition membranaire en glycoprotéines et en glucolipides qui modifierait les interactions hôte-pathogènes. Enfin, certaines données confirmeraient l'importance de la localisation et du fonctionnement du CFTR dans l'action anti-microbienne⁸³.

2.3.3. Réponse inflammatoire délétère

En conditions pathologiques normales et en réponse à l'agression des tissus par des agents pathogènes, l'épithélium respiratoire déclenche une réponse inflammatoire dont le but est l'élimination de ces pathogènes et la réparation tissulaire des zones lésées. Cette réponse se traduit par la sécrétion de médiateurs inflammatoires primaires comme l'interféron γ (IFN- γ) ou le TNF- α qui à leur tour activent la sécrétion de médiateurs secondaires par les cellules épithéliales (médiateurs lipidiques, cytokines, dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote).

Chez les patients CF, l'atteinte respiratoire est caractérisée par une infection chronique des voies aériennes associée à une inflammation délétère qui se traduit par une accumulation de polynucléaires neutrophiles (PMNs), une augmentation de plusieurs médiateurs proinflammatoires (interleukine (IL)-6, IL-8, IL-1β et IL-17) et une diminution des marqueurs anti-inflammatoires (IL-10 et lipoxines)⁹⁵. Une des grandes questions animant la communauté scientifique concerne le rôle du *CFTR* dans l'inflammatoire intrinsèque chez les patients CF. Cette hypothèse ne fait pas consensus. Pourtant, plusieurs groupes ont rapporté l'existence de marqueurs inflammation précoce chez les patients CF^{96–99}. De plus, plusieurs études ont suggéré que la réponse inflammatoire est disproportionnée chez les patients CF^{100–103}. Néanmoins, le rôle du CFTR reste controversé. Celui-ci interviendrait à travers différents composants, mécanismes et voies de signalisation.

L'effet du *CFTR* sur la réponse inflammatoire via la voie de signalisation NF-ĸB a été mis en évidence dans différents types de cultures CF et non-CF *in vitro*^{104–106}. D'autres études ont rapporté une diminution de la quantité des molécules IL-10 et de monoxyde d'azote qui préservent l'activité d'IĸBα, un inhibiteur majeur du facteur de transcription NF-ĸB. D'autres voies de régulation du facteur NF-κB sont impliquées dans l'activation de la réponse inflammatoire notamment la voie de signalisation liée au calcium intracellulaire et celle des MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*)¹⁰⁷. L'activation du facteur de transcription NF-κB conduit à l'expression de l'IL-8 et du GM-CSF et conséquemment à un recrutement de PMNs, participant ainsi à l'augmentation de la réponse inflammatoire.

Le *CFTR* contribue également à l'augmentation du stress oxydatif^{93,108}. Afin de contrôler les lésions dues à la présence d'oxydants, les cellules épithéliales sécrètent des molécules antioxydantes, notamment le glutathion ou les ions SCN⁻, dont l'une des fonctions est la détoxification des dérivés réactifs de l'oxygène. Les ions SCN⁻ possèdent également une activité anti-microbienne. Le GSH et les ions SCN⁻ sont transportés à la surface apicale des cellules épithéliales par le canal CFTR. Dans le contexte CF, le défaut de transport de ces molécules est associé à l'activation de la voie NF-κB. Ainsi, la sécrétion des médiateurs proinflammatoires recrutant les PMNs et la réduction des défenses anti-oxydantes et antibactériennes de l'épithélium participent à l'inflammation délétère.

Plusieurs études ont montré que le gène *CFTR* était transcrit et fonctionnel dans plusieurs types de leucocytes. Les données indiquent que ces cellules ne présentent pas de fonctionnement anormal en dehors du tissu pulmonaire chez les patients CF, observation qui tend à exclure un défaut primaire des cellules immunitaires lié au gène *CFTR*. Cependant, la fonction du CFTR dans ces cellules de l'immunité reste peu connue. Plusieurs études se sont intéressées à la fonction phagocytaire et sa possible altération chez les patients CF. Painter *et al.* ont observé un défaut de production d'acide hypochloreux impliqué dans la destruction des bactéries à l'intérieur des phagolysosomes des PMNs de patients CF¹⁰⁹. Ils ont également émis l'hypothèse que le transport d'ions Cl⁻ par le CFTR contribue de façon significative à la destruction de *P. aeruginosa*, ce qui impliquerait une diminution des capacités phagocytaires des PMNs dans un contexte CF¹¹⁰. Di *et al.* quant à eux ont suggéré
un défaut d'acidification des phagolysosomes dans les macrophages alvéolaires qui réduirait leur capacité à détruire les bactéries¹¹¹. Ces observation ont cependant été contestées^{112,113}.

2.3.4. Remodelage de l'épithélium pulmonaire

L'épithélium respiratoire constitue une barrière physique et fonctionnelle entre l'hôte et l'environnement. Cependant, le contact de l'épithélium respiratoire avec l'environnement extérieur le soumet à des agressions mécaniques et infectieuses qui peuvent conduire à l'apparition de lésions menaçant son intégrité. En conditions physiologiques normales comme lors des phases de croissance, les lésions de l'épithélium pulmonaire sont réparées via un remodelage du tissu par des mécanismes complexes et peu connus. La réparation implique une activation des cellules progénitrices qui prolifèrent et repeuplent la lésion, une migration cellulaire qui permet le recouvrement de la zone lésée et une différenciation cellulaire qui permet de reconstruire un épithélium pseudostratifié fonctionnel. Certaines cellules entre dans une voie de différenciation sécrétoire pour donner naissance aux cellules caliciformes productrices de mucus, tandis que d'autres voient l'activation du processus de ciliogénèse. Celui-ci requiert la polarisation préalable de la cellule et constitue un processus de différentiation terminale.

Différents effecteurs régulent les mécanismes de réparation et de régénération de l'épithélium respiratoire^{114,115}. Les composants de la matrice extracellulaire (MEC) jouent un rôle prépondérant lors de la phase d'étalement et de migration des cellules progénitrices. Celle-ci s'effectue grâce à l'adhérence du pôle antérieur des cellules aux protéines de la MEC via des contacts focaux et primordiaux coordonnée à leur libération au pôle postérieur. Parmi ces composants, la fibronectine, les laminines et le collagène de type IV de la lame basale servent de support de migration. La synthèse des protéines de la MEC est régulée par la sécrétion de médiateurs inflammatoires comme le TGF-β ou celle des histamines par les cellules de l'immunité ou les cellules épithéliales elles-mêmes. Parmi les effecteurs de la réparation, on trouve également des systèmes protéolytiques, notamment les métalloprotéases matricielles (MMPs). Ces enzymes protéolytiques participent à la migration cellulaire et au remodelage de la MEC^{115,116}. Bien qu'exprimées de manière constitutive par les cellules épithéliales respiratoires pour une fonction de défense de l'hôte,

les MMPs-7 participent également à la régénération de l'épithélium¹¹⁷. Enfin, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et plusieurs facteurs de croissance sont impliqués dans la migration et la prolifération (EGF, HGF, KGF, IL-1 α , IL-1 β) et/ou la différenciation cellulaire (EGF, PDGF, TFF)^{114,115}. Certains facteurs interviennent de façon indirecte, par exemple les IL-8 et IL-13 qui stimulent respectivement l'expression de MMPs et la sécrétion de facteurs de croissance.

Cependant, ces mécanismes de la réparation de l'épithélium pulmonaire peuvent être altérés dans des pathologies d'infection chronique des voies respiratoires comme l'asthme ou la mucoviscidose. Histologiquement, l'atteinte pulmonaire liée au défaut du gène *CFTR* est caractérisée par des modifications structurales des tissus plus ou moins importantes selon le stade de la maladie : bronchectasie, kystes bronchogéniques, atélectasie, fibrose, altérations du système vasculaire¹¹⁸. Le remodelage chronique de l'épithélium respiratoire se traduit par une altération de la taille, de la masse et du nombre des composants tissulaires qui ne permettent plus une fonction respiratoire normale. En conditions pathologiques, toutes les phases de la réparation peuvent être affectées : défaut de migration et prolifération cellulaires et/ou altération de la différentiation cellulaire. Ceci conduit à différents types de lésions épithéliales : métaplasie malpighienne, hyperplasie des cellules à mucus ou des cellules basales, hypertrophie des glandes sous-muqueuses, augmentation de la hauteur de l'épithélium, épaississement de la lame basale^{115,118}.

Historiquement, le défaut de remodelage associé à la mucoviscidose a été expliqué par les cycles répétés d'infection et d'inflammation subis par les tissus pulmonaires. Cependant, la séquence des évènements liant infection, inflammation et remodelage n'est pas encore complètement élucidée. D'autres hypothèses ont été proposées qui lieraient le remodelage incorrect au défaut du gène *CFTR* et à l'établissement d'une protection par l'épithélium luimême. En 2007, Hajj *et al.* ont étudié la réparation de la surface épithéliale respiratoire dans un modèle de xénogreffe humain chez une souris *nude*¹¹⁹. Pour cela, ils ont ensemencé des trachées de rat Wistar avec des cellules épithéliales nasales CF non-infectées et non-CF, qu'ils ont ensuite greffées chez des souris immunodéficientes. La régénération de l'épithélium respiratoire dans les conditions CF a été caractérisée par un remodelage, une augmentation de la prolifération cellulaire et un retard de différenciation dans les greffons

CF, associés à une dérégulation de l'expression de certains effecteurs de la réparation (MMP-7, MMP-9, TIMP-1 et IL-8). Le rôle du gène *CFTR* dans la réparation de l'épithélium respiratoire a ensuite été confirmé par les travaux de Schiller *et al.*¹²⁰ et de Trinh *et al.*¹²¹ Les premiers ont observé un retard de la réparation épithéliale associé à une diminution de la protrusion des lamellipodes participant à la migration cellulaire après inhibition du *CFTR* (inhibiteur Inh-172 ou expression stable de *short hairpin* RNA (shRNA), cf. 4.2.2.3) dans des cellules de la lignée Calu-3. Ces résultats ont également été obtenus avec une lignée épithéliale F508del/ F508del. Trinh *et al.* ont confirmé l'altération de la migration de cellules primaires présentant une invalidation fonctionnelle du canal CFTR (inhibiteur Gly-H101 ou expression de siRNA, cf. 4.2.2.2) associée à une altération de la trajectoire des cellules. Contrairement à l'étude précédente, une diminution de la prolifération associée au défaut du *CFTR* a également été observée. La correction de ce défaut par le composé VRT-325 a permis d'augmenter la vitesse de réparation dans des lignées cellulaires CF.

Plusieurs rôles du CFTR sont envisagés pour expliquer l'altération des mécanismes de réparation (Figure 10)^{120,122}. La migration des cellules progénitrices implique une modification de la forme et du volume cellulaire. Ce dernier est notamment régulé par l'activité de canaux potassiques. Ainsi, la sécrétion des ions Cl⁻ par le canal CFTR permettrait le maintien d'une force motrice pour le fonctionnement d'autres canaux. Le canal CFTR aurait également un rôle plus direct via une régulation du pH extracellulaire grâce la sécrétion des ions HCO₃⁻ et son interaction avec l'échangeur Cl⁻/HCO₃⁻. En effet, un pH extracellulaire acide favorise l'adhésion cellulaire tandis qu'un pH extra-cellulaire alcalin permet la libération des interactions.



<u>Figure 10</u> : Rôles potentiels du canal CFTR dans la migration et la prolifération cellulaire lors de la réparation des épithéliums pulmonaires¹²².

De nouvelles études sur le rôle du *CFTR* dans les mécanismes de réparation de l'épithélium respiratoire sont nécessaires en témoigne l'existence de résultats contradictoires sur l'effet du *CFTR* sur la prolifération cellulaire.

2.4. La recherche clinique : vers une nouvelle génération des approches thérapeutiques

2.4.1. Les modulateurs du CFTR mutation-spécifiques

Trois types de thérapies visent à corriger un défaut du gène CFTR.

Les potentiateurs de la protéine CFTR concernent les classes de mutation III et IV. En 2012, lvacaftor (molécule VX770 commercialisée sous le nom de Kalydeco) est le premier traitement adressant un défaut de la protéine qui s'adresse aux patients présentant au moins une mutation G551D. Des études sont actuellement en cours pour tester un élargissement à d'autres mutations impliquant un défaut d'ouverture du canal et à la mutation R117H¹²³⁻¹²⁶.

Les correcteurs de la protéine CFTR concernent les mutations de classe II notamment la mutation F508del. Il s'agit de molécules chaperonnes qui permettent le repliement correct des protéines et ainsi leur adressage à la membrane. Le Lumacaftor (molécule VX809) a montré des premiers résultats prometteurs et est actuellement en essai clinique en association avec l'Ivacaftor. Cependant les premiers résultats semblent contradictoires. Une autre molécule (VX661), est actuellement à l'étude^{123–126}.

Certains agents thérapeutiques permettent la lecture des codons-stop prématurés. Il s'agit de certains antibiotiques aminoglycosidiques comme la gentamycine ou de l'Ataluren (PTC124) qui permettent la production d'une protéine fonctionnelle. Un essai clinique associant l'Ataluren (qui ne présente pas le profil toxique des antibiotiques aminoglycosidiques) avec la tobramycine inhalée est actuellement en cours^{123,125,126}.

2.4.2. Les voies alternatives de sécrétion ionique

La correction des déséquilibres hydriques et du pH par la stimulation de canaux autres que les canaux CFTR est apparue assez tôt et possède l'avantage de s'adresser à l'ensemble des patients CF sans restriction. Une première approche consiste à normaliser l'activité des canaux ENaCs. Les efforts actuels cherchent à développer des inhibiteurs à long terme plus efficaces que l'amiloride (sans effet lorsque l'atteinte est installée), à inhiber les protéases activatrices des ENaCs ou à réprimer l'expression de ces canaux par des shRNA. La seconde approche consiste à stimuler les canaux chlore distincts du CFTR. Des progrès importants ont été réalisés dans ce domaine au cours des dernières années et plusieurs candidats ont été découverts. Une troisième approche cherche à stimuler les canaux potassiques basolatéraux pour forcer les mouvements de chlore^{124,125}.

2.4.3. Les stratégies d'hydratation du liquide de surface

Le dysfonctionnement de la protéine CFTR au niveau de l'épithélium respiratoire est à l'origine d'une déshydratation du liquide de surface et de la production d'un mucus visqueux qui réduisent l'efficacité de la clairance mucociliaire et créent un environnement propice aux agents pathogènes. Restaurer une hydratation adéquate du liquide de surface est donc un des enjeux de la thérapie. Deux approches sont utilisées préférentiellement. La première utilise une solution saline hypertonique (généralement à 7%) qui permet une amélioration de la clairance mucociliaire et diminue l'exacerbation. La seconde utilise le mannitol pour créer un gradient osmotique générant un flux hydrique au niveau de l'épithélium pulmonaire^{123,126}.

2.4.4. Les agents antimicrobiens et anti-inflammatoires

La colonisation du tissu pulmonaire par *P. aeruginosa* constitue un tournant négatif dans la maladie. Des antibiotiques spécifiques ont été développés dont la tobramycine et l'aztreonam qui sont les seuls actuellement recommandés. Cependant, l'apparition des phénomènes de résistance incite au développement de nouveaux antibiotiques (levofloxacine, amikacine, colistine) et de nouveaux systèmes d'administration (tobramycine en poudre). Un anticorps recombinant anti-P.a.PcrV bloquant la fonction de sécrétion de type III responsable de la virulence et des effets pro-inflammatoires de ce pathogène est actuellement en cours d'essai^{123,126}.

L'inflammation délétère observée au niveau de l'épithélium pulmonaire participe grandement à sa détérioration. L'ibuprofène a démontré sa capacité à réduire la progression de l'atteinte pulmonaire mais l'existence d'effets indésirables limite son usage intensif. L'élastase produite par les neutrophiles possède l'effet le plus délétère sur les tissus épithéliaux, et régule de manière positive d'autres protéases et augmente les risques d'infection à *P. aeruginosa*. L' α 1-antitrypsine, inhibiteur principal de ces élastases produites par les neutrophiles, est toujours en cours d'étude et a déjà démontré des bénéfices^{123,126}.

2.4.5. La thérapie génique et cellulaire

La thérapie génique additionnelle consiste à introduire dans des cellules cibles un gène fonctionnel remplaçant un gène défectueux, un gène à action thérapeutique ou encore des ARN afin de réguler l'expression d'un gène altéré. Dès le clonage du gène CFTR en 1989, la thérapie génique a généré de nombreux espoirs dans la communauté scientifique. Cependant, malgré plusieurs essais, un bénéfice clinique n'a pas encore été démontré. Les premiers essais cliniques ont utilisé les adénovirus. Une correction partielle et non persistante a été obtenue. L'administration répétée de ces vecteurs s'est révélée inefficace du fait d'une réponse immunitaire. Un second type de vecteur viral, les virus adéno-associés, a également été testé mais leur faible efficacité de transfert dans le poumon, leur faible capacité d'encapsidation et l'existence d'une réponse immunitaire n'ont pas permis d'atteindre des résultats satisfaisants. Actuellement, de nouvelles stratégies utilisant des vecteurs lentiviraux sont en cours de développement. L'utilisation des vecteurs non viraux est également envisagée malgré une expression faible et transitoire du transgène. La réponse immunitaire est limitée voire inexistante et permet ainsi des applications répétées. Cette approche est utilisée pour le programme le plus avancé à ce jour et géré par le consortium britannique UK cystic fibrosis gene therapy consortium. Il s'agit d'un traitement associant un plasmide exprimant le CFTR (pGM169) à un vecteur lipidique non viral (GL67A). Les résultats d'un essai clinique de phase IIB sont attendus pour le deuxième semestre 2014^{123,126,127}.

De nouvelles stratégies prenant avantage du développement de la thérapie cellulaire (hESC et iPSC) et des nouvelles stratégies de modification ciblée du génome sont à l'étude^{124,125}.

3. Les modèles d'étude de la mucoviscidose

Le clonage du gène *CFTR* et l'identification de la protéine ont considérablement accéléré la recherche sur la mucoviscidose au cours des 25 dernières années. Ces deux découvertes ont permis l'étude génétique du défaut associé à la maladie mais également le développement de modèles cellulaires et animaux. Ceux-ci sont essentiels à la compréhension des mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires intervenant dans la pathologie ainsi qu'au développement de nouvelles thérapies pour les patients.

3.1. Les lignées cellulaires immortalisées

Le développement de lignées cellulaires CF et non-CF a apporté un bénéfice considérable pour l'étude de la maladie. En effet, leur technique de culture relativement simple et peu couteuse permet l'obtention rapide d'un grand nombre de cellules. Les lignées cellulaires répondent ainsi à la faible disponibilité des tissus primaires et au nombre et à la viabilité limités des cellules issues des biopsies. L'utilisation de lignées cellulaires permet également la réalisation d'études à grande échelle (stratégies haut-débit) sur des échelles de temps réduites comparées aux études *in vivo*.

3.1.1. Méthodes d'immortalisation des lignées cellulaires

Différentes approches sont utilisées pour générer des lignées cellulaires immortelles. L'immortalisation peut être spontanée dans le cas de cellules issues de carcinomes ou initiée par insertion d'oncogènes viraux par transfection ou transduction. Parmi les plus utilisés, on retrouve l'antigène T ou l'origine de réplication du virus simien 40 (SV40-LT ou pSV-ori respectivement), les gènes E6 et E7 du papillomavirus humain (E6/E7 HPV) ou encore l'utilisation de virus hybrides adéno-SV40¹²⁸. Certaines équipes ont également associé le SV40-LT et le transgène de la télomérase humaine *hTERT* (*human telomerase reverse transcriptase*)¹²⁸.

L'antigène T du SV40 inactive les protéines suppressives de tumeur p53 et du rétinoblastome (pRB) et perturbe leur liaison avec les co-activateurs CBP (*CREB binding protein*) et p300 favorisant un passage en phase S du cycle cellulaire. Les oncogènes E6 et E7

possèdent également des propriétés transformantes. Le premier induit la dégradation de p53, augmente l'expression d'inhibiteurs de l'apoptose et active l'expression de la sous-unité protéique de hTERT qui maintient la longueur des télomères et prévient l'apoptose. Ceci permet une transition de la phase G1 à la phase S. E7 induit la dégradation de pRB et de ses partenaires ce qui promeut une dérégulation du cycle cellulaire. Ces systèmes favorisent ainsi la prolifération illimitée des cellules.

Plus récemment, une stratégie d'immortalisation a utilisé l'expression combinée du protooncogène murin *Bmi-1* et du transgène *hTERT* pour générer de nouvelles lignées cellulaires épithéliales bronchiales¹²⁹. Bien que la croissance cellulaire soit légèrement plus faible et plus lente, cette approche permettrait d'obtenir des lignées cellulaires génétiquement stables et dont la structure et les fonctions seraient plus préservées qu'avec les approches précédentes.

3.1.2. Les lignées cellulaires utilisées dans le cadre de la recherche sur la mucoviscidose

Les lignées cellulaires CF et non-CF sont issues de différents tissus provenant de différentes espèces. Bien que non-exhaustive, la liste des lignées cellulaires les plus utilisées et leurs caractéristiques sont détaillées dans le tableau 1.

Parmi toutes ces lignées cellulaires, la lignée Calu-3 est encore aujourd'hui une référence pour les modèles *in vitro* de l'épithélium respiratoire humain. Elle a été développée en 1975 à partir d'effusions pleurales d'un patient atteint d'un cancer du poumon¹³⁰ et est issue des glandes sous-muqueuses des bronches. Les premières cultures de cellules primaires différenciées provenant des glandes sous-muqueuses ayant été décrites en 2010¹³¹, la plupart des études d'absorption et de sécrétion ont été réalisées à partir de cette lignée¹³². En 1994, Shen et *al.*¹³³ décrivent la formation de monocouches confluentes de cellules Calu-3 avec présence de jonctions serrées et d'une résistance transépithéliale dans lesquelles la stimulation à l'AMPc déclenche une augmentation des courants d'ions Cl⁻. Depuis, plusieurs études ont rapporté ses caractéristiques proches de celles de l'épithélium respiratoire humain^{132,134,135}. Les cellules Calu-3 cultivées sur membrane semi-perméable forment une monocouche confluente et expriment les protéines des jonctions intercellulaires majeures

(jonctions serrées, jonctions communicantes, desmosome, zonula adherens). Une résistance transépithéliale est mesurée et sa valeur est maximale après 10 à 14 jours de culture. Les transports sont assurés par des pompes et des canaux notamment le CFTR qui y est très fortement exprimé. Il existe deux types de cultures : à l'interface air-liquide ou submergée. La culture à l'interface air-liquide est plus proche des conditions physiologiques et la morphologie des cellules (en colonne) est similaire à celles des structures observées *in vivo*¹³⁶. Des microvillosités se développent au niveau apical¹³⁷ et il existe une sécrétion de mucus épais (détection des mucines MUC5AC et MUC5B). En culture submergée, les cellules Calu-3 sont de forme cuboïdale et seules des vésicules de sécrétion sont observées, sans production de mucus. Toutes ces caractéristiques en font un modèle de choix pour l'étude des transports ioniques, des études pathophysiologiques ou encore pour des applications pharmacologiques¹³⁵.

Très récemment, Harrington *et al.* ont utilisé les cellules Calu-3 dans un modèle en trois dimensions de l'épithélium respiratoire¹³⁸. Pour obtenir un tel modèle, ils ont cultivé des cellules Calu-3 (cellules épithéliales), des fibroblastes (correspondant à une matrice) et des cellules dendritiques (cellules immunitaires) sur des supports poreux individuels qu'ils ont ensuite superposés. Après culture à l'interface air-liquide pendant 4 semaines, les cellules épithéliales avaient formé des jonctions serrées et une résistance transépithéliale a pu être mesurée, tandis que la stimulation avec des allergènes a induit la migration des cellules dendritiques à travers l'assemblage 3D.

Parmi l'ensemble des lignées cellulaires disponibles, l'avantage particulier des cellules Calu-3 réside dans sa capacité de polarisation et ses caractéristiques proches de l'épithélium respiratoire *in vivo*. Cependant, ces cellules de nature cancéreuse ne reproduisent pas la complexité de l'épithélium et une validation de la corrélation Calu-3 / *ex vivo* / *in vivo* reste indispensable.

Nom	Origine	Génotype/Phénotype	Modification	Description ^{références}	
Cellules humaines					
Calu-3	Glandes sous-muqueuses des bronches	WT-CFTR	Adénocarcinome	Description détaillée en 3.1.2. ^{132,139}	
9HTE0 ⁻	Trachée/Bronches	WT-CFTR	pSV-ori	Transport d'ions Cl ⁻ normal, propriétés similaires à celles des cellules primaires ¹⁴⁰	
NCF3	Polypes nasaux	F508del/F508del	AdE1+SV40	Résistance transépithéliale, observation d'un transport d'ions Cl suite à une augmentation du calcium intracellulaire, pas d'effet de l'AMPc sur les efflux d'ions Cl ⁻¹⁴¹	
JME/CF-15	Polypes nasaux	Patient CF	SV40-LT	Résistance transépithéliale, formation de jonctions serrées, absence de sécrétion d'ions Cl ⁻ en réponse à une augmentation de l'AMPc intracellulaire ou de la stimulation de la PKC ¹⁴²	
IB3.1 ou CFBEIB3.1	Bronches	F508del/W1282X	AdV12+SV40	Existence de canaux ORCC à la membrane apicale et régulation anormale des courants Cl ⁻ , présence de la mutation F508del sur au moins un des chromosomes ¹⁴³	
S9	Bronches (issues des cellules IB3.1)	Expression WT-CFTR (pAAV-CFTR et pAAV- neo)	Transfection	Restauration de l'efflux de Cl ⁻ après stimulation avec de l'isoprotérénol et de l'IBMX (correction du phénotype CF) ¹⁴⁴	
HBE	Bronches	WT-CFTR	E6/E7 HPV	Résistance transépithéliale, cellules « contrôle » pour CFT1 ¹⁴⁵	
CFT1	Trachée	F508del/F508del	E6/E7 HPV	Résistance transépithéliale, ensemencement sur support avec collagène et culture avec un milieu de différenciation induisent une différenciation en feuillets, cellules utilisées pour une correction du phénotype CF à long terme en utilisant un rétrovirus ¹⁴⁵	
16HBE140 ⁻	Bronches	WT-CFTR	pSV-ori	Formation de jonctions serrées et résistances transépithéliales en culture immergée sur Transwell, cellules non sécrétrices, expression protéique fortement diminuée dans les CFBE410 ⁻ , localisation anicale et intracellulaire de la protéine dans les	
CFBE410	Bronches	F508del/F508del	pSV-ori	16HBE140 ⁻ et CFBE410 ⁻ respectivement, fonction de sécrétion et d'absorption diminuée dans les CFBE410 ^{-146–148}	
AA	Bronches	WT-CFTR	hTERT+SV40-LT	Résistance transépithéliale ¹²⁸	
КК	Bronches	F508del-CFTR	hTERT+SV40-LT	Résistance transépithéliale ¹²⁸	

Nom	Origine	Génotype/Phénotype	Modification	Description ^{références}
CFT43	Voies respiratoires	F508del-CFTR	SV40-LT	Résistance transépithéliale ¹²⁸
CFNPE140	Polypes nasaux	F508del/F508del	pSV-ori	Résistance transépithéliale et absence de courants Cl ⁻ AMPc- dépendants ¹⁴⁹
2CFSME0 ⁻	Glandes sous-muqueuses	F508del/Q2X	pSV-ori	128,150
6CFSME0 ⁻	Glandes sous-muqueuses	F508del/Q2X	pSV-ori	128,150
CFNPE90 ⁻	Polypes nasaux	?	pSV-ori	128,150
56FHTE80 ⁻	Trachée/Bronches	WT-CFTR	pSV-ori	128,150
1HAE0 ⁻	Trachée/Bronches	WT-CFTR	pSV-ori	Résistance transépithéliale ^{128,151}
CFDEo	Trachée/Bronches	Patient CF	pSV-ori	128,151
CFBE450	Bronches	F508del/R117H	pSV-ori	128
CFBE460	Bronches	R117H/?	pSV-ori	128
CFTE290	Trachée/Bronches	F508del/F508del	pSV-ori	Pas de courant Cl ⁻ AMPc-dépendant ¹²⁸
HSME60 ⁻	Glandes sous-muqueuses	WT-CFTR	pSV-ori	128
HSME820 ⁻	Glandes sous-muqueuses	WT-CFTR	pSV-ori	128
HTE67tsa2090 ⁻	Trachée/Bronches	WT-CFTR	Plasmide tsa209	128,150
MM-39	Glandes sous-muqueuses	WT-CFTR	SV40	Caractéristiques similaires aux cellules d'origine avec conservation de la réponse au carbachol, à l'isoprotérénol et à l'AMPc ¹⁵²
CF-KM4	Glandes sous-muqueuses	F508del/F508del	SV40	Absence de réponse au carbachol et à l'isoprotérénol, défaut de régulation des canaux Cl ⁻ AMPc-dépendants, correction du phénotype avec un adénovirus ¹⁵³
CFT-1	Trachée	S549N/N1303K SV40-LT		Défaut de régulation du transport des ions Cl ⁻ caractéristique de
CFT-2	Trachée	F508del/F508del	SV40-LT	la mucoviscidose ¹⁵⁴
Caco-2	Colon	WT-CFTR	Adénocarcinome	Formation de jonctions serrées, différenciation et polarisation pour des cultures sur Transwell, résistance transépithéliale ^{130,155}
T84	Colon	WT-CFTR	Adénocarcinome	Résistance transépithéliale, formation de jonctions serrées ^{128,156}
HT29 CI.19A	Colon	WT-CFTR	Adénocarcinome	Clone ayant émergé spontanément après traitement de cellules HT29 au sodium butyrate, polarité basale/apicale, formation de jonctions serrées, résistance transépithéliale ¹⁵⁷
CFPAC-1	Pancréas	F508del/F508del	Adénocarcinome	Présence de canaux Cl ⁻ ne répondant pas à la forskoline (hypothèse qu'il s'agit du produit de l'expression du <i>CFTR</i>) ¹⁵⁸

Nom	Origine	Génotype/Phénotype	Immortalisation	Description ^{références}	
CFPAC-1 Null	Pancréas	F508del-CFTR (rétrovirus)	Transduction	Mêmes caractéristiques et propriétés que la lignée parentale ¹⁵⁹	
CFPAC-1 WT-CFTR	Pancréas	WT-CFTR (rétrovirus)	Transduction	Correction du phénotype CF et restauration des courants Cl ⁻ AMPc-dépendants ¹⁵⁹	
CFI-3	Intestins	S549N/N1303K	pSV-ori	Conservation du génotype CF et du défaut de régulation des canaux Cl ⁻¹⁶⁰	
HeLa WT-CFTR	Utérus	WT-CFTR (T7/vaccinia)	Transduction	Augmentation de la perméabilité aux anions et des courants Claprès stimulation à l'AMPs dans la lignée WT CETP mais pas dans	
HeLa F508del- CFTR	Utérus	F508del-CFTR (T7/vaccinia)	Transduction	la lignée F508del-CFTR ¹⁶¹	
Cellules de rat					
IEC-6	Intestins	Absence de CFTR	Spontanée	Formation de jonctions serrées, présence de microvillosités ¹⁶²	
IEC-7	Intestins (issues des IEC-6)	Wt-CFTR	Transfection stable	Restauration d'une perméabilité aux ions Cl ⁻ après stimulation à la forskoline ¹⁶³	
FRT Null	Thyroïde de rat Fisher	Absence de CFTR (rétrovirus)	Transduction	Fortes résistances transépithéliales lorsqu'elles sont polarisées,	
FRT WT-CFTR	Thyroïde de rat Fisher	WT-CFTR (rétrovirus)	Transduction	absence de canal Cl ⁻ régulé par l'AMPc dans la lignée parentale	
FRT F508del-CFTR	Thyroïde de rat Fisher	F508del-CFTR (rétrovirus)	Transduction	d'où l'absence d'interférence lorsque le canal CFTR est exprimé ¹⁶⁴	
Cellules de souris					
NIH 3T3 WT-CFTR	Fibroblastes	WT-CFTR (T7/vaccinia)	Transduction	Augmentation de la perméabilité aux anions et des courants Cl ⁻	
NIH 3T3 F508del- CFTR	Fibroblastes	F508del-CFTR (T7/vaccinia)	Transduction	après stimulation à l'AMPc dans la lignée WT-CFTR uniquement	
L WT-CFTR	Fibroblastes	WT-CFTR (phosphate de Ca ²⁺)	Transfection stable	Défaut du transport des ions Cl ⁻ après stimulation à la forskoline	
L F508del-CFTR	Fibroblastes	F508del-CFTR (phosphate de Ca ²⁺)	Transfection stable	CFTR ¹⁶⁵	
C127 WT-CFTR	Glande mammaire	WT-CFTR	Modification	Efflux d'ions Clipperès stimulation de la DKC et du DNAA dans les	
C127 F508del- CFTR	Glande mammaire	F508del-CFTR	Modification	cellules exprimant le WT-CFTR uniquement ¹⁶⁶	

Nom	Origine	Génotype/Phénotype	Immortalisation	Description ^{références}		
mCT1	Rein (tubes collecteurs)	Souris S489X ^{+/-}	Transgène H-2K ^b - tsA58			
mCT1-CF	Rein (tubes collecteurs)	Souris S489X ^{-/-}	Transgène H-2K ^b - tsA58			
mPEC1	Pancréas	Souris S489X ^{+/-}	Transgène H-2K ^b - tsA58	Augmentation de la perméabilité aux ions Cl ⁻ après stimulation avec de l'isoprotérénol et de l'IBMX dans les lignées non-CF uniquement, faible augmentation dans les lignées mPEC1-CF et		
mPEC1-CF	Pancréas	Souris S489X ^{-/-}	Transgène H-2K ^b - tsA58			
mSEC1	Glande salivaire	Souris S489X ^{+/-}	Transgène H-2K ^b - tsA58	Formation de jonctions serrées et polarisation après culture sur		
mSEC1-CF	Glande salivaire	Souris S489X ^{-/-}	Transgène H-2K ^b - tsA58	non-CF uniquement ¹⁶⁷		
mTEC1	Trachée	Souris S489X ^{+/-}	Transgène H-2K ^b - tsA58			
mTEC1-CF	Trachée	Souris S489X ^{-/-}	Transgène H-2K ^b - tsA58			
Cellules de hamster						
CHO WT-CFTR	Ovaires	WT-CFTR (T7/vaccinia)	Transduction	Augmentation de la perméabilité aux anions et des courants Cl		
CHO F508del-CFTR	Ovaires	F508del-CFTR (T7/vaccinia)	Transduction	la lignée F508del-CFTR ^{161,168}		
Cellules de chien						
MDCK II WT-CFTR	Rein	WT-CFTR (LVV dérivé du HIV)	Transduction	Absence d'expression endogène du <i>CFTR</i> , polarisation lors de la culture sur membrane semi-perméable, WT-CFTR localisée à la membrane apicale et F508del-CFTR localisée autour du noyau,		
MDCK II F508del- CFTR	Rein	F508del-CFTR (LVV dérivé du HIV)	Transduction	sécrétion d'ions Cl ⁻ après stimulation à la forskoline dans la lignée WT-CFTR uniquement, absence de transport d'ions Na ⁺ dans les deux lignées ¹⁶⁹		

Tableau 1 : Caractéristiques des principales lignées cellulaires immortalisées utilisées dans la recherche sur la mucoviscidose.

3.1.3. Limitations associées aux lignées cellulaires immortalisées

La transformation et l'immortalisation de lignées cellulaires ont permis de grandes avancées dans la recherche sur la mucoviscidose mais leur utilisation présente quelques limites :

- les clones de cellules isolés proviennent de populations de cellules primaires ayant des caractéristiques phénotypiques distinctes.
- chaque clone isolé correspond à une sous-population de cellules primaires qui peuvent exprimer les caractéristiques phénotypiques du type cellulaire principal d'origine ou non.
- le processus de transformation ou d'immortalisation peut altérer ou influencer l'expression de certaines caractéristiques (polarisation, formation de cils et/ou de jonctions serrées, sécrétion, ...).
- les passages multiples peuvent modifier les caractéristiques originales (par exemple le caryotype) et une nouvelle sous-population peut être sélectionnée.
- des caractéristiques présentent *in vivo* ou dans des cellules primaires peuvent être différentes ou totalement absentes (morphologie, fonctions, résistances transépithéliales, ...).
- l'absence de réponse intégrée ne permet pas la prise en compte de l'influence d'autres tissus ou systèmes de l'organisme et des substances sécrétées.

Chaque lignée cellulaire possède ses caractéristiques propres et doit être choisie en fonction du type de recherche effectuée et selon les questions posées.

3.1.4. Utilisation des cellules souches embryonnaires et pluripotentes induites humaines

La première lignée de cellules souches embryonnaires humaines (hES) a été décrite en 1998¹⁷⁰. Depuis, ces cellules font l'objet d'études considérables du fait de leurs propriétés remarquables. Les cellules hES ont en effet la capacité de se multiplier à l'infini tout en conservant celle de se différencier en n'importe quel type cellulaire.

En 2005, Pickering *et al.*¹⁷¹ décrivent une lignée de cellules hES F508del/F508del. Ces cellules conservent une morphologie et un profil d'expression protéique caractéristiques des autres cellules hES. Ils pointent l'importance de telles lignées dans lesquelles la protéine mutée est exprimée dans son contexte physiologique normal. Dérivées de patients ayant différents génotypes, elles sont un excellent outil d'étude et de comparaison *in vivo*. D'autres lignées CF-hES ont été générées depuis (F508del/E585X, F508del/3849+10kbC>T, F508del associée au variant 5T)^{172,173}. Cependant, la disponibilité des embryons et les réglementations éthiques peuvent limiter voire interdire l'accès à ce type de cellules.

En 2006, Takahashi et Yamanaka¹⁷⁴ proposent un protocole de différenciation de cellules humaines adultes (fibroblastes) en cellules pluripotentes induites (hiPS). Ces cellules possèdent les mêmes caractéristiques que les cellules hES. Leur origine permet de répondre au problème de la réglementation et facilite leur accès. Depuis, plusieurs lignées de cellules CF-hiPS ont été créées^{175,176}.

La différenciation de cellules souches pluripotentes (hES et hiPS) en cellules de type respiratoire est réalisée dès 2007¹⁷⁷. Wang *et al.* proposent un protocole de transformation et de culture permettant d'obtenir des cellules alvéolaires de type II dont les caractéristiques biologiques et morphologiques sont celles de cellules normales, et qui expriment le gène CFTR. Plusieurs autres protocoles sont ensuite développés et concernent essentiellement les cellules alvéolaires de type I et II¹⁷⁸ bien que les maladies associées à ce type cellulaire soient moins importantes en terme de nombre de patients que les maladies des voies respiratoires. En 2012, Mou et al.¹⁷⁵ se basent sur le développement embryonnaire des poumons chez la souris pour obtenir des cellules respiratoires progénitrices à partir de cellules hiPS de patient CF. Cependant, la pureté n'est pas totale et ces cellules ne sont pas capables de se différencier en type cellulaire des voies respiratoires (cellules basales, ciliées, ...). La même année, Wong et al.¹⁷⁶ publient un protocole de différenciation de cellules hES normales et CF-hiPS suivi d'une phase de culture à l'interface air-liquide permettant de générer un épithélium respiratoire contenant des cellules basales, ciliées et à mucus avec présence de jonctions serrées. Dans les cellules normales, le canal CFTR est localisé au pôle apical et fonctionnel et une expression de mucine MUC5AC est observée. Au contraire, la protéine CFTR n'est pas détectée à la membrane dans les cellules issues des cellules CF-hiPS. Quelques zones de détection sont observées lorsque ces cellules sont traitées avec un

analogue du VX809 (correcteur de la protéine F508del). Une activité des canaux AMPcdépendants est mesurée dans quelques cultures issues des cellules hES normales mais également dans certaines cultures issues des cellules CF-hiPS. Cette hétérogénéité proviendrait de la différence de proportion de cellules exprimant le *CFTR* dans chaque culture. Cette année, deux équipes ont rapporté la différenciation de cellules souches pluripotentes en cellules des voies respiratoires fonctionnelles (expression des mucines MUC5AC, MUC2 et MUC5B, absorption des protéines B du surfactant, mesures de courants AMPc-dépendants et sensibles à l'inhibiteur 172, ciliogénèse)^{179,180}.

Bien que ce domaine de recherche soit encore relativement récent, les derniers résultats constituent une avancée significative vers la modélisation *in vitro* de maladies respiratoires comme la mucoviscidose. Les études pourront être patient-spécifiques et des thérapies individualisées pourront être testées.

3.2. Les cultures cellulaires primaires

Certaines caractéristiques des lignées cellulaires CF et non-CF imposent des limites à leur utilisation (cf. 3.1.3). La mise au point de cultures de cellules primaires a permis de surmonter certaines de ces limites. En effet, les cellules primaires sont plus proches des tissus et des conditions de culture spécifiques permettent de reproduire les caractéristiques et fonctions observées *in vivo*. De plus, ces cellules sont isolées par rapport aux autres composants de l'organisme ce qui permet d'étudier l'influence de certains facteurs séparément. Les cultures primaires sont issues de cellules épithéliales provenant de différents organes (intestins, canaux collecteurs, épithélium nasal, glandes sous-muqueuses, ...) et espèces animales. Ce travail de thèse étant orienté vers la mise au point d'un modèle de la mucoviscidose dans les cellules épithéliales respiratoires humaines, seules les cultures primaires issues de ce type cellulaire sont décrites ci-après.

3.2.1. De la culture des cellules primaires respiratoires humaines sur boites à la formation d'épithéliums pseudo-stratifiés mucociliés

Les cultures primaires de cellules respiratoires humaines sont disponibles depuis plus de 30 ans. En 1982, Lechner et al.¹⁸¹ mettent au point des conditions de culture spécifiques (composition du milieu et optimisation des surfaces de culture) qui permettent la croissance de cellules épithéliales bronchiales humaines et sont très vite suivis par d'autres équipes. Widdicombe et al.¹⁸² décrivent la formation d'une monocouche de cellules épithéliales trachéales polarisées formant des jonctions serrées et des microvillosités au pôle apical et mesurent une résistance transépithéliale, une différence de potentiel (DDP) et des courants de court-circuit lorsque ces cellules sont cultivées sur une surface poreuse. La même année, les équipes de Boucher rapportent la différenciation de cellules épithéliales nasales¹⁸³ ainsi que de cellules issues de patients CF¹⁸⁴. En culture, les cellules épithéliales nasales prennent une forme en colonne, sont ciliées et sont capables de repeupler des greffons de trachée dénudés. Les effets de l'amiloride sur la DDP sont plus importants dans les cellules CF tandis que le remplacement du chlore au pôle apical induit une hyperpolarisation plus faible. Des mesures de la perméabilité aux ions Na⁺ et Cl⁻ réalisées quelques années plus tard confirmeront les anomalies bioélectriques associées à la mucoviscidose dans ces cultures primaires ¹⁸⁵.

Bien que la polarisation des cellules soit observable grâce à ces méthodes de culture, les cellules cultivées sur boites restent peu différenciées. En 1986, Steele *et al.*¹⁸⁶ fabriquent des filtres en cellulose, en polycarbonate recouvert de collagène et des membranes de collagène et démontrent l'intérêt de la culture sur un support poreux pour améliorer l'état de différenciation des cultures primaires. Cela permet également l'utilisation de milieux de culture différents dans chacun des compartiments et leur prélèvement isolé. Deux ans plus tard, Whitcutt *et al.*¹⁸⁷ développent un système de culture primaire différenciée de cellules épithéliales respiratoires. La différenciation en cellules ciliées et en cellules à mucus s'avère plus compliquée et requiert des conditions de culture particulières^{188,189}. Différentes méthodes sont mises au point dans les années 1990. Plus particulièrement, Yamaya *et al.*¹⁹⁰

d'obtenir des cellules épithéliales trachéales humaines qui conservent la structure originale du tissu et qui possèdent des capacités de transports ioniques plus fortes. L'amélioration de l'état de différentiation a été obtenue grâce à l'association du gel Vitrogen (support) à l'Ultroser G (substitut de sérum dans le milieu) et une culture à l'interface air-liquide. Aujourd'hui, le système le plus utilisé associe membrane semi-perméable, milieux adaptés à la prolifération et à la différenciation et culture à l'interface air-liquide^{191,192}. Une étude récente a étudié la ressemblance de trois types de culture avec l'épithélium respiratoire *in vivo* d'un point de vue transcriptionnel¹³⁶. L'analyse du profil d'expression sur génome entier a permis de démontrer une plus grande similarité des cultures primaires différenciées à l'interface air-liquide avec les tissus *in vivo* comparées à des cellules primaires cultivées sur boite ou à des cellules Calu-3 cultivées à l'interface air-liquide.

Une des limites associées à la culture de cellules primaires est la diminution des capacités de différenciation lorsque les cellules prolifèrent. Afin d'augmenter le pool de cellules primaires disponibles tout en conservant leur capacité de différenciation, Galieta *et al.*¹⁹³ ont proposé protocole comprenant une première étape de prolifération des cellules épithéliales bronchiales humaines jusqu'à 6 passages puis un ensemencement à haute densité sur des supports semi-perméables dans un milieu contenant du sérum afin de stimuler la différenciation. Une deuxième contrainte limite l'utilisation des cultures primaires : leur faible durée de vie. En 2006, Wiszniewski *et al.*¹⁹⁴ proposent une méthode d'amplification de cellules primaires issues de polypes nasaux suivie de leur culture à l'interface air-liquide en présence de cellules nourricières (fibroblastes). Ils obtiennent ainsi un épithélium pseudo-stratifié et mucocilié qui conserve ses caractéristiques phénotypiques initiales (CF ou non-CF) et dont la durée de vie est de plusieurs mois.

Les sources de cellules épithéliales primaires sont aujourd'hui multiples. Elles proviennent historiquement et essentiellement du tissu nasal, trachéal ou bronchial. Les cellules issues des voies respiratoires de petit calibre¹⁹⁵ ou des glandes trachéales¹³¹ ont été utilisées plus tardivement mais ont un intérêt majeur dans l'étude de certains aspects des maladies respiratoires.

3.2.2. Limitations associées aux cultures cellulaires primaires

La culture primaire de cellules épithéliales respiratoires humaines en conditions différenciées est physiologiquement très proche des cellules respiratoires *in vivo*. Cependant, il existe quelques limites à son utilisation. La disponibilité des tissus est faible voire nulle pour certaines équipes de recherche et leur coût commercial reste encore très élevé. Bien que des protocoles de prolifération permettant ensuite une différenciation aient été mis au point, le nombre de cellules disponibles reste très faible en comparaison des lignées cellulaires et est responsable d'une grande variabilité entre les expériences. De plus, il existe une grande variabilité des génotypes (par exemple pour des cultures issues de différents patients F508del/F508del) et de l'historique des infections et traitements reçus par les patients. Enfin, la culture des cellules primaires est une technique sensible, longue (1 mois de différenciation) et chère.

3.3. Les modèles animaux de la mucoviscidose

L'utilisation de modèles animaux reste essentielle pour comprendre et décrire les pathologies humaines et connaitre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu. Ceci ne peut être réalisé entièrement chez les individus pour des considérations éthiques et personnelles. Les modèles animaux permettent également de développer des thérapies en phase préclinique en mettant au point des protocoles et en analysant les effets sur des organismes entiers. Il n'existe pas de modèle spontané de la mucoviscidose. Il a donc été nécessaire d'en développer.

3.3.1. Les modèles murins

3.3.1.1.Les modèles murins CF stricto sensu

Quelques années avant l'identification du gène *CFTR*, plusieurs équipes ont décrit des altérations des sécrétions pancréatiques et des glandes exocrines similaires à celles observées chez les patients CF chez des lapins et des rats traités à la réserpine^{196,197}. D'autres équipes ont constaté une inhibition des transports épithéliaux du chlore après un traitement aux diurétiques¹⁹⁸. A l'époque, ces modèles étaient envisagés pour étudier certains aspects

de la pathologie CF. Le clonage du gène *CFTR* en 1989 a ensuite permis le développement des premiers modèles murins de la mucoviscidose grâce à la méthode de recombinaison homologue dans des cellules embryonnaires développée par Capecchi, Evans et Smithies. Depuis 15 modèles ont été créés, caractérisés et utilisés pour la recherche^{199,200}. Le tableau 2 résume les différents modèles de souris CF développés, le type de modification et de mutation ainsi que leurs caractéristiques principales.

D'un point de vue phénotypique, il existe une variabilité des pathologies observées et de leur sévérité. Cependant, de manière générale, on note :

- une très forte sévérité de l'atteinte intestinale caractérisée par des obstructions et une mortalité périnatale élevée, celle-ci étant lignée-dépendante en témoigne les souches CFTR^{tm1Hgu}, CFTR^{tm2Hgu} et CFTR^{tm1Eur} pour lesquelles celle-ci est plus modérée,
- des caractéristiques phénotypiques au niveau des muqueuses respiratoires et intestinales proches de celles observées chez les patients CF,
- une atteinte de l'appareil reproductif moins sévère que celle observée chez les patients CF,
- l'absence d'atteinte pancréatique marquée à l'exception des souris CFTR^{tm3Bay},
- l'absence d'atteinte hépatobiliaire marquée à l'exception de quelques anomalies variables selon les souches,
- l'absence d'atteinte rénale à l'exception de quelques souches présentant une sécrétion de protéines urinaires anormale,
- l'absence de phénotype respiratoire spontané malgré la présence de quelques anomalies histologiques ou sécrétoires et d'une augmentation de la sensibilité à *P. aeruginosa* dans certaines souches.

Modèle	Phénotype	Mutation	ARNm	Année	Caractéristiques ^{références}
CFTR ^{tm1Unc}	CFTR ^{-/-}	S489X R exon 10	ND	1992	Mortalité périnatale très élevée due à l'obstruction intestinale ²⁰¹ ; courants chlore AMPc-dépendants similaires à ceux observés chez les patients (épithéliums intestinal, nasal et trachéal) ²⁰² ; pas de phénotype pancréatique ou respiratoire ²⁰³ ; détection d'un ARNm issu d'un épissage alternatif mais en quantité moindre que l'ARNm normal chez les souris hétérozygotes ²⁰⁴ .
CFTR ^{tm1Hgu}	CFTR ^{-/-}	l exon 10	10% WT	1992	Défaut du transport des ions chlore (épithéliums gastro-intestinal et respiratoire), caractéristiques histologiques similaires à celles observées chez les patients, pas de signe d'atteinte pancréatique ou respiratoire, phénotype modéré ²⁰⁵ ; développement de deux nouvelles souches de fond génétique différent avec une espérance de vie normale, une fonction électrophysiologique améliorée et l'expression protéique correspond à 4-9% de celle des souris non-CF ²⁰⁶ .
CFTR ^{tm1Cam}	CFTR ^{-/-}	R487X R exon 10	ND	1992	Mortalité périnatale très élevée due à l'obstruction intestinale ²⁰⁷ .
CFTR ^{tm1Bay}	CFTR ^{-/-}	l exon 3	<2% WT	1993	Mortalité périnatale très élevée due à l'obstruction intestinale, anomalies pathologiques au niveau gastro-intestinal, pas d'atteinte respiratoire ou de l'appareil reproducteur, défaut du transport des ions chlore (iléum et explants fœtaux de trachée) ²⁰⁸ .
Tg(FABPCFTR)				1994	Expression du <i>CFTR</i> humain au niveau intestinal grâce au promoteur spécifique FABP afin de limiter la mortalité périnatale et la sévérité de l'atteinte chez les souris CFTR ^{tm1Unc 209} . Correction partielle du phénotype intestinal avec restauration des courants transépithéliaux sauf dans la région du colon.
CFTR ^{tm2Cam}	F508del/F508del	R	30% WT	1995	Mortalité périnatale élevée due à l'obstruction intestinale mais légèrement plus faible que pour les souris <i>Null</i> , phénotype proche des souris <i>Null</i> malgré des anomalies électrophysiologiques en accord avec un phénotype CF (épithéliums du colon et trachéal), protéine F508del thermosensible ²¹⁰ .
CFTR ^{tm1Eur}	F508del/F508del	H&R	Normal	1995	Pas de diminution du niveau des ARNm mais défaut électrophysiologique confirmé (épithélium nasal, intestin et vésicule biliaire), activité résiduelle du CFTR responsable d'un phénotype modéré ²¹¹ ; protéine F508del thermosensible ²¹² .
CFTR ^{tm1Kth}	F508del/F508del	R	Faible dans les intestins	1995	Taille et espérance de vie réduites comparées aux souris non-CF, atteinte intestinale, anomalies du transport des ions chlore AMPc-dépendant (épithéliums nasal, intestinal et du canal pancréatique), absence de phénotype respiratoire ²¹³ .

Modèle	Phénotype	Mutation	ARNm	Année	Caractéristiques ^{références}
CFTR ^{tm3Bay}	CFTR ^{-/-}	R exon 2	ND	1995	Phénotype intestinal sévère mais mortalité périnatale légèrement plus faible que les modèles <i>Null</i> précédents, absence de courants AMPc-dépendants (épithélium de colon) ²¹⁴ .
CFTR ^{tm2Hgu}	G551D ^{-/-}	R	50% WT	1996	Forte diminution des courants associés au CFTR (4% WT, épithéliums nasal et intestinal), espérance de vie plus importante que pour les modèles précédents, anomalies de la vésicule biliaire, des glandes séreuses et à mucus, cirrhose biliaire focale, pas de pathologie pulmonaire, pancréatique ou de l'appareil reproducteur franche ²¹⁵ ; réponse à une infection chronique à <i>P. aeruginosa</i> induite (agar) moins efficace que chez les souris non-CF ²¹⁶ .
CFTR ^{tm1Hsc}	CFTR ^{-/-}		ND	1996	Souris congéniques dérivées de CFTR ^{tm1Unc} , réduction de la mortalité périnatale, sévérité de l'atteinte génétiquement déterminée ²¹⁷ ; atteinte pulmonaire spontanée et progressive, changements histologiques compatibles avec une atteinte obstructive des voies respiratoires de petit calibre observée chez les patients ²¹⁸ ; avec l'âge pathologie progressive qui atteint plusieurs organes et très similaire à celle observée chez les patients, absence d'infection bactérienne chronique spontanée, augmentation de la mortalité en cas d'infection bactérienne induite, atteinte pancréatique avec quelques différences par rapport aux patients ²¹⁹ .
CFTR ^{tm3Hgu}	G480C ^{-/-}	H&R	Normal	2002	Phénotype modéré, espérance de vie normale, poids normal, fertilité normale, absence de signe d'obstruction intestinale, absence de détection de la protéine mutée au pôle apical des cellules, anomalies des courants chlore AMPc-dépendants (épithélium nasal) ²²⁰ .
CFTR ^{tm3Uth}	CFTR ^{-/-}	Y122X R exon 4	ND		199
CFTR ^{tm2Uth}	R117H ^{-/-}	R	5-20% WT		199

R : remplacement, I : insertion, H&R : technique du *Hit and Run*, ND : non détectable. Les références sont indiquées en exposant (d'après^{199,200}).

Tableau 2 : Modèles murins de la mucoviscidose et leurs caractéristiques.

Un modèle murin d'hyperabsorption de sodium a été généré en 2004. Bien que n'étant pas un modèle de la mucoviscidose au sens strict, la souris Tg(CCSPScnn1b) présente un phénotype très proche des manifestations cliniques et de la pathologie de l'atteinte respiratoire précoce associée à la mucoviscidose. Il est caractérisé par une déplétion du liquide de surface des voies respiratoires, des anomalies du transport de mucus, une obstruction des voies respiratoires, des signes de bronchite chronique avec accumulation de macrophages et de neutrophiles⁸⁴. L'hyperabsorption de sodium affecterait ainsi la clairance mucociliaire via une déplétion du liquide de surface et jouerait un rôle critique dans la mise en place de l'atteinte pulmonaire²²¹.

Un modèle de rat CFTR^{-/-} a été décrit cette année par Tuggle *et al*²²². Ils ont utilisé la technologie des ZFNs (*zinc finger nucleases*) afin d'introduire une délétion de 16 pb dans l'exon 3 du gène *CFTR*. Des anomalies de la DDP nasale ont été observées. Des mesures du courant transépithélial n'ont pas montré d'hyperabsorption de Na⁺. Bien qu'un iléus méconial n'ait pas été décrit, l'atteinte intestinale se manifeste après le sevrage par des obstructions intestinales. Après 6 semaines, les rats CFTR^{-/-} présentent une déplétion du liquide de surface, des anomalies de la taille des glandes sous-muqueuses, de la sécrétion et de la production de mucus ainsi qu'une absence des canaux déférents. L'atteinte respiratoire n'est pas observée mais les animaux sont jeunes et gardés en conditions stériles.

Un modèle rat de la mucoviscidose présente plusieurs avantages par rapport aux modèles développés chez la souris. En effet, la répartition des glandes sous-muqueuses depuis la trachée jusqu'aux bronches est plus proche de l'Homme que ne l'est celle observée chez la souris. De plus, la taille plus importante des animaux permet une plus grande disponibilité de tissu et une facilité de manipulation lors des procédures chirurgicales.

3.3.1.2.Les modèles murins d'infection à Pseudomonas aeruginosa

Malgré l'absence d'infection bactérienne chronique spontanée chez les modèles murins CF, plusieurs équipes ont induit une infection de ce type avec des pathogènes associés à l'atteinte respiratoire^{199,200,223}. Plusieurs méthodes ont été décrites notamment l'inoculation intra-trachéale avec un agent immobilisant (agar, agarose, alginate provenant d'algue), l'apport de *P. aeruginosa* par l'eau de boisson, l'inoculation intra-trachéale de

lipopolysaccharides issus de bactéries ou encore l'infection intra-trachéale avec une souche de *P. aeruginosa* mucoïde stable²²⁴.

Ces méthodes ont été appliquées chez le rat et chez différentes souches de souris et ont induit une infection chronique durant plusieurs semaines. Sont observées : une infection avec lésions des tissus similaires à celles observées chez les patients CF et une augmentation des facteurs de l'inflammation. Cependant, il faut noter que la sensibilité à *P. aeruginosa* peut être très variable selon la souche de souris utilisée, certaines n'ayant pas d'infection chronique ni de symptômes associés.

Ces méthodes ont également été appliquées à des modèles murins de la mucoviscidose afin d'étudier l'influence du *CFTR* sur la résistance de l'hôte aux pathogènes et le rôle de l'inflammation et de la réponse immunitaire dans la protection contre l'infection chronique^{199,200,223}. Un défaut de clairance de l'infection à *P. aeruginosa* a été associé à une réponse inflammatoire (CFTR^{tm1Unc}), à une augmentation de la mortalité (CFTR^{tm1Hsc}) ou encore à une augmentation de la charge bactérienne et des médiateurs pro-inflammatoires (CFTR^{tm2Hgu}) chez des souris CF *versus* des souris non-CF²¹⁶. L'application de ces techniques avec les pathogènes *S. aureus* et *B. cepacia* n'a pas permis l'obtention d'une infection chronique mais une charge bactérienne plus élevée et une réponse inflammatoire aigue ont été observées chez certaines souches de souris CF.

3.3.1.3.Limitations associées aux modèles murins de la mucoviscidose

La limitation principale à l'utilisation des modèles de souris CF réside dans l'absence de phénotype respiratoire spontané comparable à celui observé chez les patients. Il existe des différences morphologiques notables notamment une différence d'architecture pulmonaire. Il existe peu de glandes sous-muqueuses chez la souris et leur localisation est restreinte à la trachée, tandis que chez l'Homme, ces glandes sont présentes jusque dans les bronches. Les types de canaux ioniques exprimés dans les glandes sous-muqueuses diffèrent également. Cette différence de composition se retrouve au niveau du pancréas. Si les canaux CFTR sont peu nombreux chez la souris, on y trouve une quantité assez importante de canaux chlore Ca²⁺-dépendants. Au contraire, le pancréas est l'organe où l'expression du *CFTR* est la plus

abondante chez l'Homme. D'un point de vue moléculaire, la conservation d'identité entre l'Homme et la souris est de 78% environ pour la protéine, un chiffres bien inférieur à ceux observés pour d'autres espèces (primates non-humains, cochon ou encore furet)²²⁵. Enfin, la taille limite également la mise au point de protocoles de délivrance de produits thérapeutiques ou de monitoring qui restent délicats.

3.3.2. Les modèles de la mucoviscidose chez le gros animal3.3.2.1.Les modèles porcins

Les caractéristiques anatomiques, physiologiques et biochimiques font du cochon un candidat idéal pour un modèle de la mucoviscidose²²⁶. Son génome possède une taille et une complexité similaires à celles de l'Homme (93% d'identité protéique). Le canal CFTR porcin (pCFTR) est AMPc-dépendant, possède une probabilité d'ouverture similaire à celle du CFTR humain (hCFTR) et sa localisation est apicale dans les cellules respiratoires différenciées et polarisées. Enfin, sa taille permet de tester de nouvelles thérapies et de nouvelles méthodes de monitoring.

La technique de modification des cellules embryonnaires et de leur réimplantation utilisée pour générer des modèles de souris transgéniques a montré ses limites pour le développement de modèles chez le gros animal. Il a fallu attendre plusieurs années pour que la technique du transfert nucléaire de cellules somatiques soit efficace.

Rogers *et al.* ont généré les premiers cochons hétérozygotes CFTR^{+/-} et F508del^{+/-} en 2008²²⁷ en utilisant un AAV recombinant ciblant le *CFTR* dans des fibroblastes fœtaux. Par croisement, ils ont ensuite obtenu le premier modèle de cochon CFTR^{-/-228}. Les porcelets ^{+/+}, ^{+/-} et ^{-/-} ont tous une apparence similaire à la naissance. Cependant, les manifestations gastro-intestinales sont sévères chez les cochons CF avec une pénétrance de 100% pour l'iléus méconial. L'ARNm et la protéine normale ne sont pas détectés. Il existe une perte d'activité du canal CFTR au niveau de l'épithélium nasal chez les cochons ^{-/-} uniquement. Les changements histologiques du pancréas sont similaires à ceux observés chez les patients CF. A la naissance, aucun des porcelets ne présente d'anomalie morphologique ou pathologique au niveau des voies respiratoires. En 2010, la même équipe²²⁹ rapporte des lésions de

l'intestin, du pancréas, du foie et de la vésicule biliaire proches de celles observées chez les patients associées à une inflammation cellulaire modérée. Quelques mois après leur naissance, les cochons CFTR^{-/-} développent spontanément des traits de caractère de l'atteinte respiratoire : inflammation, remodelage, accumulation de mucus et infection²³⁰. La présence d'un large spectre de souches bactériennes indique un défaut des mécanismes de défense. Bien que l'inflammation ne soit pas présente chez les cochons nouveau-nés, les tissus sont moins stériles. L'élimination bactérienne défectueuse initierait donc la cascade vers l'inflammation et la pathologie respiratoire.

En 2011, Ostedgaard *et al.*²³¹ présentent le premier cochon F508del/F508del. L'épithélium respiratoire conserve une faible conductance du canal CFTR (environ 6% du contrôle). La stimulation des courants par l'AMPc génère des réponses plus faibles chez les cochons mutants. Malgré cette activité résiduelle, quatre cochons adultes ont développé des atteintes gastro-intestinales et pulmonaires comparables à celles des patients CF. Ce modèle est suivi un an plus tard par celui de Klymiuk *et al*²³². Le phénotype est très similaire à celui des premiers cochons F508del/F508del avec des atteintes intestinale, pancréatique, respiratoire et hépatobiliaire.

Plus récemment, Stoltz *et al.* ont généré un cochon CFTR^{-/-} dont le phénotype intestinal est corrigé²³³, similaire à l'approche de Zhou *et al.* chez la souris²⁰⁹. Pour cela, ils ont prélevé des fibroblastes chez un fœtus du cochon CFTR^{-/-} développé par Rogers *et al.*²²⁸, puis les ont stablement transfectés avec un plasmide exprimant le *CFTR* porcin sous contrôle du promoteur intestinal-spécifique iFABP. Les clones positifs ont ensuite été utilisés comme donneur pour la technique du transfert nucléaire dans des oocytes énucléés pour obtenir des porcelets CFTR^{-/-}TgFABP>pCFTR. Ceci a permis de prévenir la survenue d'un iléus méconial chez ces porcelets, éliminant le besoin d'une intervention chirurgicale et diminuant la mortalité périnatale. Dans ce modèle, le gène *CFTR* est exprimé et fonctionnel au niveau des intestins, tandis que le phénotype CF est conservé au niveau des poumons, du pancréas, de la vésicule biliaire et du foie.

3.3.2.2.Le modèle furet

Plusieurs caractéristiques anatomiques et physiologiques rendent le furet attractif pour la mise au point d'un modèle animal de la mucoviscidose²³⁴ notamment :

- une similarité physique et morphologique des voies aériennes avec l'Homme,
- l'expression du gène CFTR au niveau de l'épithélium respiratoire et des glandes sousmuqueuses,
- une conservation des acides aminés du CFTR à 97% identique avec l'Homme,
- une période de gestation relativement courte (42 jours) et une maturité sexuelle atteinte vers 6 mois donc plus rapide que la plupart des gros animaux.

Comme pour le développement des modèles porcins de la mucoviscidose, les premiers furets CFTR^{+/-} ont été générés en 2008²³⁵ grâce à la technique du transfert nucléaire de cellules somatiques modifiées. Le premier modèle de furet CFTR^{-/-} a été décrit par Sun *et al.*²³⁶ en 2010 et présente plusieurs similarités avec le phénotype observé chez les patients CF. Comme chez le modèle porcin, l'atteinte intestinale à la naissance est très sévère et a été corrigée par l'expression spécifique du canal CFTR au niveau de l'intestin.

Chez les furets CFTR^{-/-} juvéniles et adultes, Sun *et al.*^{236–239} constatent :

- une atteinte respiratoire avec un défaut de sécrétion du Cl⁻, un profil de sécrétion des glandes sous-muqueuses anormal, une obstruction des voies aériennes, une prédisposition à l'infection pulmonaire, une augmentation de la charge bactérienne, un défaut de clairance mucociliaire et des bronchopneumopathies,
- une destruction progressive du pancréas exocrine et endocrine,
- une hyperplasie des muqueuses de la vésicule biliaire,
- une atteinte hépatique caractérisée par une anomalie de la tolérance au glucose, une altération de la distribution des ilots, une augmentation de l'apoptose des cellules acineuses et ductales et une régulation de la sécrétion d'insuline anormale (seuls deux animaux sur 13 ont été décrits comme pancréatique-suffisants),
- des ulcérations gastriques,
- une accélération de la croissance bactérienne au niveau intestinal et une atrophie des villosités,
- un prolapsus rectal.

A la différence du modèle porcin de la mucoviscidose, l'atteinte hépatique est moins sévère à la naissance ce qui donne une opportunité d'étudier les phases précoces du diabète associé à la mucoviscidose²³⁷.

3.3.2.3.Limitations associées aux modèles de la mucoviscidose chez le gros animal

Bien que les modèles chez le gros animal soient essentiels pour certaines maladies comme la mucoviscidose pour laquelle les modèles murins ne sont pas toujours adaptés (phénotype respiratoire), il existe plusieurs limites à leur utilisation :

- le coût élevé de recherche et de développement,
- la place et le coût liés à l'élevage,
- le coût élevé des études précliniques et les volumes d'agents thérapeutiques requis,
- la durée des expérimentations,
- la disponibilité des modèles pour la communauté scientifique,
- la méconnaissance de certains mécanismes de la maladie dans ces modèles au départ non favorisés pour la recherche fondamentale (bien que les nouvelles technologies comme le séquençage à haut-débit comblent certaines lacunes).

4. <u>Invalidation du gène CFTR pour la mise au point d'un modèle cellulaire de</u> la mucoviscidose

4.1. Stratégies de modification de l'expression génétique

La modification de l'expression génétique consiste en l'augmentation ou l'inhibition de l'expression d'un ou plusieurs gènes ou à l'expression d'une nouvelle information génétique. Cette modification peut être transitoire ou permanente. Différentes technologies existent qui permettent la modulation de l'expression d'un gène.

Plusieurs types de nucléotides synthétiques interagissent avec les séquences ADN ou avec l'ARN messager (ARNm) activant ou inhibant ainsi l'expression de protéines, ou possèdent une activité catalytique. Il s'agit des ADN/ARN antisens, des ribozymes, des aptamères ou encore des ARN interférents. Les endonucléases induisent des cassures double-brin (CDB) au sein même du génome et permettent l'introduction de mutations lors de leur réparation invalidant ainsi l'expression de gènes. Ces nucléases peuvent être fusionnées avec des domaines activateurs ou inhibiteurs de la transcription pour moduler l'expression génétique. L'apport d'une information génétique complémentaire peut être réalisé grâce à des méthodes chimiques (transfection, vecteurs non-viraux), physiques (électroporation) ou grâce à l'utilisation de vecteurs viraux. Cependant, si l'information est intégrée dans le génome de la cellule cible, le locus d'intégration n'est pas contrôlé. L'utilisation des endonucléases artificielles ou des transposons permet de répondre à ce problème.

Pour ce travail de thèse, j'ai choisi d'utiliser les stratégies de l'interférence ARN et des endonucléases artificielles. En effet, l'interférence ARN est une technique simple qui a démontré son potentiel et son efficacité. Cette stratégie est assez rapide et facile à mettre en œuvre et s'adapte à nos outils de transfert de gène. De plus, il est possible de sélectionner les cellules modifiées. La stratégie utilisant les endonucléases artificielles a été choisie pour sa capacité à induire une modification permanente et ciblée du génome.

4.2. Inhibition partielle de l'expression génétique par la voie de l'interférence ARN *4.2.1.* Principe de l'interférence ARN

Un dogme de la biologie moléculaire voulait que l'ensemble des informations utiles contenues dans l'ADN soient transcrites en ARNm puis traduites en protéines²⁴⁰. Il existait alors deux types d'ARN : les ARNm et les ARN non codants (ARNnc). Cependant, les progrès dans le domaine de la génétique et l'apparition des techniques de séquençage à haut débit ont permis de démontrer l'importance fonctionnelle de ces ARNnc majoritaires dans le génome. L'existence d'une interaction des ARN avec l'expression génétique est découverte dès le début des années 1990^{241,242} mais c'est en 1998 que Fire *et al.*²⁴³ démontrent pour la première fois l'inhibition de l'expression protéique par des ARN double brin (ARNds) chez *Caenorhabditis elegans*. Il faudra attendre 2001 pour que cette voie de régulation soit observée chez les Mammifères. En effet, ces derniers possèdent un système de protection induisant l'apoptose des cellules infectées par des ARNds de grande taille et seuls des brins courts d'une vingtaine de nucléotides permettent d'inhiber l'expression génétique²⁴⁴. Depuis l'interférence ARN fait l'objet de recherches intenses et plusieurs essais cliniques ont été initiés^{245–253}.

L'interférence ARN intervient dans l'ensemble des cellules de l'organisme et permet une régulation spatio-temporelle fine de l'expression génétique au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel ou traductionnel. Cette régulation est assurée par des ARN longs de plusieurs centaines de nucléotides ou par des petits ARN d'une vingtaine de nucléotides (cf. 4.2.2) et repose sur la complémentarité de bases entre l'ARN interférent (ARNi) et sa cible. Lorsque la complémentarité est parfaite, l'ARN cible est clivé. Dans les autres cas, le complexe ARNi:ARN cible gêne l'expression correcte de la protéine ou l'expression d'un gène (cf. 4.2.3). Historiquement, l'interférence ARN est décrite comme étant responsable de l'inhibition partielle de l'expression génétique mais des études récentes ont confirmé ses fonctions activatrices. Elle assure le contrôle de différents mécanismes cellulaires (développement embryonnaire, différenciation, prolifération, apoptose, angiogénèse ou encore chimio-résistance) et permet de lutter contre les infections virales.

L'utilisation des ARNi présente plusieurs avantages. Cette technique souple et peu couteuse est rapide et simple à mettre en place. L'inhibition partielle et réversible permet l'étude de phénotypes polymorphiques. L'interférence ARN se révèle également plus efficace que certaines approches lorsque la cible étudiée est dite *non druggable*, c'est-à-dire que les protéines impliquées n'ont pas de fonction enzymatique ou leur conformation rend leur accès difficile aux traitements conventionnels. Enfin, elle permet la répression de membres particuliers de familles multigéniques autorisant ainsi une étude « isolée » de ces gènes.

4.2.2. Les ARN non codants de la voie de l'interférence ARN

Il existe trois classes d'ARNnc intervenant dans la voie de l'interférence ARN : les micro ARN (miRNA), les petits ARN inhibiteurs ou *small interfering RNA* (siRNA) et les ARN interagissant avec les protéines PIWI ou *PIWI-interacting RNA* (piRNA). Les miRNA et piRNA sont des effecteurs endogènes de l'interférence ARN tandis que les siRNA sont des effecteurs exogènes. Une quatrième classe d'ARNi a été développée : les petits ARN en épingle à cheveux ou *short hairpin RNA* (shRNA). Ces ARN constituent une alternative aux siRNA et peuvent être vectorisés pour assurer une expression exogène stable.

Les piRNA ont été identifiés au niveau nucléaire chez les plantes, les champignons et plus récemment les métazoaires. Ils sont impliqués dans le blocage d'éléments mobiles de l'ADN comme les transposons, le maintien du génome ou encore la réparation de l'ADN²⁴⁶. Leur intervention ne concernant pas les ARNm et la régulation de la traduction, ces ARNi et leurs mécanismes d'action ne seront pas développés ici.

4.2.2.1.Les miRNA

Les miRNA sont des petits ARNi comprenant en moyenne 18 à 23 nucléotides qui interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle et traductionnelle séquence-spécifique. Ils ont été largement décrits chez les Mammifères et les insectes. La base de données qui les recense contient à ce jour plus de 28 000 entrées²⁵⁴.

La plupart des miRNA sont issus des régions intergéniques et possèdent leur propre système d'expression. Un quart à un tiers des miRNA proviennent des régions introniques et utilisent le système d'expression de la région codante dans laquelle ils sont localisés^{251,252}. Ils sont transcrits en pri-miRNA (primary miRNA) par les polymérases de type II et III et subissent les mêmes transformations que les ARNm, c'est-à-dire l'ajout d'une coiffe à l'extrémité 5' et une poly-adénylation de l'extrémité 3'. Les pri-miRNA sont ensuite pris en charge par la voie de biosynthèse des miRNA (cf. 4.2.3.1) qui assurent la dégradation de la cible ou la répression de la traduction (cf. 4.2.3.2). Un miRNA peut réguler plusieurs ARNm. Un ARNm peut être régulé par plusieurs miRNA²⁵⁵. Des études ont montré que certains miRNA peuvent également se fixer sur les pre-miRNA (intermédiaires de la voie de biosynthèse) contrôlant ainsi la biogénèse des miRNA.

Les miRNA peuvent également être issus d'ADN viraux (vi-miRNA). Ceux-ci participent alors à une régulation des ARN viraux ou à une déstabilisation des miRNA de l'hôte²⁵⁶. Ils ont été identifiés dans les virus SV40, Epstein-Barr ou encore HIV-1. Ils peuvent rejoindre la voie de biosynthèse des miRNA en plusieurs endroits²⁵¹.

4.2.2.2.Les siRNA

Les siRNA sont des ARNi exogènes de 21 à 24 nucléotides dont l'extrémité 5' est phosphorylée et l'extrémité 3' est protubérante (2 nucléotides). Cette structure est reconnue par le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*, cf. 4.2.3.1) ce qui permet leur incorporation directe dans la voie de régulation de l'expression génique. Leur demi-vie est courte mais ce sont des structures relativement stables en l'absence de nucléases²⁵³. Leur charge négative restreint leur passage à travers les membranes cellulaires. L'utilisation de méthodes de transfert comme la transfection ou l'électroporation permettent l'entrée des siRNA mais ne peuvent pas être appliquées à tous les types cellulaires²⁴⁹.

En théorie, il est possible de réprimer l'expression de n'importe quel gène grâce aux siRNA. Cependant, pour des raisons encore non élucidées, ce procédé reste imprévisible et n'est pas toujours efficace. L'obtention d'une invalidation stable et efficace nécessite donc le criblage d'un grand nombre de séquences candidates. Il existe des algorithmes et des programmes permettant de sélectionner des séquences potentielles qui doivent ensuite être validées.

4.2.2.3.Les shRNA

Les shRNA constituent une alternative stable aux siRNA et leur effet est potentiellement modulable. Ils sont transcrits dans le noyau via un vecteur d'expression exogène (viral ou bactérien) par les polymérases de type II ou III en une structure de type tige-boucle²⁵³. Lorsqu'ils sont exprimés par une polymérase III, les shRNA ne sont pas concernés par les premières phases de la biosynthèse des miRNA²⁴⁹. Leur prise en charge par la protéine DROSHA génère un pre-shRNA, ressemblant aux pre-miRNA, qui est ensuite intégré dans la voie de biosynthèse des miRNA (cf. 4.2.3.1). Les shRNA peuvent également être vectorisés avec une structure proche des miRNA et sont alors reconnus comme substrat naturel de leur voie de biosynthèse²⁴⁹. Comme pour les siRNA, l'obtention d'une invalidation efficace nécessite le criblage de plusieurs candidats.

La comparaison des trois systèmes d'interférence impliquant les miRNA, les siRNA et les shRNA est compliquée. Cependant, des études ont montré que les shRNA semblent légèrement plus efficaces que les siRNA lorsque ceux-ci sont produits de manière identique. De même, lorsque des shRNA ou des miRNA artificiels partagent le même design, les shRNA semblent être produits en plus grande quantité²⁵³.

4.2.3. Les mécanismes et intervenants cellulaires de l'interférence ARN4.2.3.1.La voie de biosynthèse des miRNA, siRNA et shRNA

Les miRNA sont les effecteurs endogènes naturels de l'interférence ARN. Leur voie de biosynthèse débute par la transcription d'un ARN de grande taille (> 1 000 pb) appelé primiRNA (Figure 11)^{245,247,251–253}. La structure en boucle associée à des extrémités 5' et 3' simple brin est essentielle pour la reconnaissance du pri-miRNA par le complexe microprocesseur. Ce complexe est composé des protéines DROSHA, DGCR8 et HDAC1. DGCR8 est une protéine très stable comprenant deux sites de fixation des ARNds et qui se lie à la protéine DROSHA. Elle permet le positionnement et l'orientation corrects du pri-miRNA. L'affinité de DGCR8 pour DROSHA est augmentée par HDAC1. Le clivage du pri-miRNA par la protéine DROSHA génère un pre-miRNA de 60-70 nucléotides avec une extrémité 3'

protubérante de deux nucléotides. Celle-ci est critique pour la reconnaissance par l'exportine 5 et l'enzyme DICER.

L'exportine 5 reconnait et fixe le pre-miRNA et s'associe spécifiquement à la protéine RanGTP. Cette dernière interagit avec les nucléoporines et permet le transfert du noyau vers le cytoplasme. La liaison à l'exportine 5 est structure-dépendante mais séquenceindépendante. La structure des pre-shRNA étant proche de celle des pre-miRNA, leurs voies de biosynthèse se rejoignent lors de cette étape (Figure 11).

Une fois dans le cytoplasme le pre-miRNA et le pre-shRNA sont pris en charge par DICER. Cette enzyme catalyse l'excision de petits ARN issus de différents substrats et est capable de discriminer les substrats peu fonctionnels des substrats fortement fonctionnels. Ceci permet une pré-sélection des ARNi actifs. DICER interagit avec les protéines TRBP et PACT qui augmentent sa vitesse d'activité et stabilisent son substrat. Le pre-miRNA et le pre-shRNA sont alors clivés en duplex de miRNA et de shRNA possédant une extrémité 3' protubérante. Les duplex de siRNA présentent une structure proche de ces derniers. La voie de biosynthèse des siRNA rejoint ici celle des miRNA et des shRNA (Figure 11).

Les duplex d'ARNi sont ensuite incorporés dans le complexe RISC composé des protéines PACT, TRBP, AGO (famille des Argonautes). Ces dernières forment le cœur du complexe. Leur domaine PAZ reconnait l'extrémité 3' protubérante des duplex d'ARNi tandis que les domaines MID et PIWI fixent le phosphate de l'extrémité 5'.La fixation d'un duplex active le complexe. Les clivages réalisés par les enzymes DROSHA et DICER ont auparavant définit un brin dont l'extrémité 5' possède une énergie libre plus faible. Ce brin dit « guide » est incorporé dans le complexe tandis que le second brin dit « passager » est dégradé par l'exonucléase C3PO. Le brin guide oriente alors le complexe RISC activé vers l'ARNm cible. Les nucléotides 2 à 8, ou *seed region*, sont responsables de l'appariement.

Seule la protéine AGO2 possède une activité catalytique et le clivage de l'ARNm cible est réalisé par son domaine PIWI. Pour les autres protéines AGO, d'autres mécanismes assurent la dégradation de l'ARNm cible (cf. 4.2.3.2).



Figure 11 : Voie de biosynthèse des miRNA, siRNA et shRNA²⁵³.

4.2.3.2.Les mécanismes de répression de l'expression génétique

Les ARNi n'agissent pas seuls mais à l'intérieur du complexe RISC. L'interaction ARNi-ARNm et l'inhibition de l'expression génétique qui en découle font intervenir plusieurs facteurs déterminants : la complémentarité des deux structures, leur accessibilité, le contexte séquentiel, la structure secondaire de l'ARNm ou encore le nombre de sites cibles pour le même ARNi. La répression de l'expression génétique intervient via différents modes d'action au niveau pré-traductionnel et co-traductionnel (Figure 12)²⁴⁸.

Lorsque la traduction n'est pas encore initiée, la dégradation de l'ARNm cible peut intervenir de trois façons différentes. La déadénylation de l'extrémité 3' ou la dégradation de la coiffe à l'extrémité 5' exposent l'ARNm à une dégradation enzymatique. Les protéines AGO peuvent également interagir avec des facteurs d'initiation de la traduction ou des hélicases empêchant ainsi la fixation des petites sous-unités ribosomales. Enfin, le complexe RISC peut empêcher la formation d'une boucle fermée de l'ARNm ce qui bloque l'initiation de la traduction.

Lorsque la traduction est initiée, le complexe RISC peut inhiber la fixation des grosses sousunités ribosomales, interagir avec des facteurs d'élongation provoquant ainsi une dissociation des sous-unités ribosomales ou un arrêt prématuré de la traduction, ou stimuler la dégradation co-traductionnelle des chaines polypeptidiques nouvellement formées.

Une autre voie de dégradation des ARNm fait intervenir des structures particulières : les *P*bodies^{248,257}. Ces structures cytoplasmiques sont composées de différentes protéines notamment les enzymes nécessaires à la dégradation des ARNm (exoribonucléases, enzyme de déadénylation et de dégradation de la coiffe) et des protéines du complexe RISC. Ces dernières seraient responsables du recrutement des *P*-bodies dans lesquels les ARNm sont séquestrés et/ou dégradés. L'entrée serait initiée par la déadénylation des ARNm. La formation des *P*-bodies serait directement liée à la voie de biosynthèse des miRNA et siRNA.
Introduction générale - Invalidation du gène CFTR pour la mise au point d'un modèle cellulaire de la mucoviscidose





4.2.4. Les effets off

Les ARNi possèdent un potentiel de régulation de l'expression génétique très important et ont été rapidement très appréciés des scientifiques pour leur accessibilité. Cependant, comme tout outil, leur utilisation présente quelques effets non désirés potentiels ou effets off^{247,249,253}.

La présence de portions d'ARNds même petite peut activer une réponse immunitaire non spécifique (par exemple celle de l'interféron) via leur interaction avec des protéines de fixation (TLR ou récepteurs des PK). La reconnaissance non-spécifique de séquences proches de celle de l'ARN cible peut également engendrer une inhibition ou une activation génique avec des conséquences délétères. Enfin, il existe un risque de saturation de la machinerie de l'interférence ARN pouvant entrainer une inhibition de la fonction des miRNA endogènes ou au contraire leur prise en charge aberrante.

Il est possible de minimiser ces effets *off* grâce à un design optimisé de l'ARNi et quelques précautions expérimentales. Le criblage et la validation de plusieurs séquences cibles permettent de limiter la reconnaissance de séquences homologues non spécifiques. La diminution de la concentration des ARNi permet quant à elle de réduire les effets de saturation de la voie de biosynthèse tout en veillant à conserver un potentiel de répression suffisant.

4.3. Modification ciblée du génome grâce aux endonucléases artificielles

En 2007, Mario Capecchi, Oliver Smithies et Martins Evans reçoivent le prix Nobel de Médecine et de physiologie pour leurs travaux sur le ciblage de gènes dans les cellules embryonnaires de souris et la mise au point de la technique du transfert d'embryons pour la génération de modèles animaux *null*. Capecchi et Smithies ont montré qu'il était possible de cibler n'importe quel gène grâce à la recombinaison homologue (RH) et ainsi de modifier le génome de cellules en culture. Cette technique a été largement utilisée pour la détermination de la fonction de nombreux gènes. Cependant, bien que très utile, la technique conventionnelle de RH présente une limitation majeure. La fréquence de ces évènements dans les cellules eucaryotes reste très faible (1/10⁶-1/10⁷). En 1994, Rouet *et al.*²⁵⁸ montrent que l'introduction d'une CDB permet d'augmenter la fréquence de RH de 2 à 3 log dans des cellules embryonnaires de souris grâce à l'utilisation d'endonucléases. Depuis, de nombreux efforts ont été entrepris pour développer les techniques de modification ciblée du génome grâce à l'utilisation d'endonucléases naturelles ou artificielles.

4.3.1. La famille des endonucléases artificielles

4.3.1.1. Présentation générale

Les endonucléases artificielles partagent la même structure générale et le même mécanisme d'action^{259–261}. Elles sont composées d'un domaine de fixation spécifique à une séquence ADN donnée fusionné à un domaine catalytique enzymatique (Fokl, Cas9 ou centre catalytique des méganucléases). L'introduction d'une CDB à un loci particulier active les systèmes de réparation de la cellule permettant ainsi l'édition ciblée d'un gène. En théorie, les domaines de fixation à l'ADN peuvent être modifiés à façon afin de reconnaitre n'importe

quelle séquence du génome. On distingue les méganucléases (MNs), les nucléases à doigt de zinc (ZFNs, *zinc finger nucleases*), les TALE (*transcription activator-like effector*) nucléases et les nucléases guidées par une séquence ARN (RGNs, *RNA-guided nucleases*). Les endonucléases artificielles doivent répondre à plusieurs exigences : spécificité stricte pour une séquence dont la taille permet une occurrence unique dans le génome, efficacité grâce à une activité de coupure robuste mais limitée à la fixation spécifique de l'endonucléase, simplicité et adaptabilité pour un ciblage multiple^{261–263}.

La modification ciblée du génome peut prendre plusieurs formes^{259–261} (Figure 13). L'invalidation de gène, ou *knock out*, est la forme la plus simple. Elle est obtenue grâce à la voie de réparation de la ligation des extrémités non homologues (NHEJ, *non homologous end joining*, cf. 4.3.4.1) qui favorise les erreurs de réparation sous la forme de petites insertions ou délétions de bases et qui ne nécessite pas l'apport d'un ADN donneur. La modification peut également consister en l'insertion d'une cassette d'expression ou *knock in*. Il s'agit d'un gène thérapeutique, rapporteur ou de résistance, d'un tag ou alors de l'insertion de mutations ponctuelles. Dans certains cas, le *knock in* permet l'insertion d'une séquence contenant un codon stop prématuré aboutissant alors à un *knock out*. Enfin, l'utilisation de plusieurs paires de nucléases permet des délétions de séquences importantes et des translocations, duplications ou inversions de chromosomes.

La modification ciblée par les endonucléases a été appliquée à différents organismes et types cellulaires, notamment les cellules ES et iPS. Un ciblage simultané de plusieurs loci a été obtenu avec les ZFNs, les TALE nucléases et les RGNs.





Nature Reviews | Genetics



Le facteur limitant majeur des endonucléases concerne l'existence d'effets *off* dus à la reconnaissance de cibles non-spécifiques présentant une homologie de séquence importante avec la séquence cible. Cette reconnaissance erronée est responsable d'une diminution de l'activité de modification des nucléases au locus d'intérêt et/ou d'une augmentation de la cytotoxicité lorsque la machinerie cellulaire n'arrive plus à inverser le niveau de coupures délétères. Les effets *off* peuvent également conduire à une mauvaise

interprétation des résultats. Plusieurs améliorations ont été apportées aux domaines de reconnaissance et catalytique des endonucléases artificielles^{260,261}. L'amélioration constante de la structure des domaines de fixation à l'ADN cherche à augmenter leur spécificité²⁶⁴. Le développement de variants hyperactifs de FokI permet également de réduire la quantité de nucléases nécessaires tout en conservant une activité de modification réduisant ainsi la probabilité des effets *off*. Enfin, le développement des ZF, TALE et CRISPR nickases constituent une alternative intéressante aux endonucléases artificielles « classiques ». Les nickases induisent en effet une coupure simple brin qui permet une augmentation de la RH sans activer la NHEJ.

4.3.1.1.Les méganucléases

Les méganucléases ou endonucléases de homing sont des enzymes hautement spécifiques qui furent à l'origine découvertes chez la levure. Ce sont des éléments mobiles qui régulent la mobilité des éléments génétiques desquels elles sont issues. Leur impact sur la RH a été rapporté dès les années 1980 mais c'est au cours de la décennie suivante que leur potentiel à générer des CDB et conséquemment à augmenter la fréquence de la RH est décrit. Il existe cinq classes de MNs, la plus étudiée étant la classe des MNs LAGLIDADG²⁶⁵⁻²⁶⁸. Les MNs enzymes homodimériques reconnaissant des LAGLIDADG sont des séquences palindromiques ou quasi-palindromiques (I-Crel) ou des enzymes monomériques reconnaissant des séquences non palindromiques (I-Scel, I-Anil). Elles possèdent un domaine de fixation à l'ADN spécifique de séquences de 14-40 pb qui contient également leur centre catalytique. Plusieurs centaines de MNs naturelles ont été identifiées mais leur très grande spécificité de séquence ne permet pas de répondre à la complexité du génome et limite leur utilisation. Plusieurs équipes ont donc cherché à développer des MNs artificielles soit en modifiant certains acides aminés des domaines de reconnaissance (design in silico) soit en fusionnant des domaines protéiques provenant de MNs distinctes. Grâce à ces approches, l'entreprise française Cellectis a développé une collection de plus de 20 000 domaines protéiques qui peuvent être combinés en hétérodimères chimériques permettant de reconnaitre des loci spécifiques. Cependant, ces approches nécessitent un long processus de validation in vitro sur des mutants de séquences et l'absence d'un code de reconnaissance à l'ADN simple limite leur large diffusion.

4.3.1.2.Les nucléases à doigt de zinc

La technologie des ZFNs a émergé au milieu des années 1990^{269} . Le domaine de fixation à l'ADN est composé de protéines ZF (ZFPs)^{259–261,263}. Il s'agit de domaines Cys₂-His₂, le domaine de fixation à l'ADN le plus présent chez les eucaryotes. Chaque domaine ZF reconnait un triplet de nucléotides via son hélice α . L'assemblage de domaines ZF, en général entre 3 et 6, permet la reconnaissance d'une séquence spécifique de 9-18 nucléotides (Figure 14). Une séquence de 18 nucléotides confère une spécificité parmi 68×10^9 bases ce qui correspond en théorie à un locus unique dans le génome.



Figure 14 : Représentation schématique d'une paire de ZFNs²⁶¹.

La séparation physique des domaines de reconnaissance et catalytique de l'enzyme Fokl²⁷⁰ a permis de rediriger spatialement son clivage en fusionnant son domaine catalytique avec d'autres domaines de reconnaissance à l'ADN, notamment les ZFPs^{269,271}. L'enzyme Fokl fonctionne à l'état de dimère²⁷² et nécessite donc la fixation d'une paire de ZFNs. La distance de fixation entre ZFNs est capitale pour initier la coupure. En effet, l'interface du dimère est assez faible et nécessite une certaine proximité des domaines catalytiques²⁷¹. Plusieurs études ont montré qu'une distance de 5-7 pb était optimale^{261,263}. Des variants de Fokl ont été développés pour fonctionner avec un espacement différent. D'autres modifications ont permis la génération de variants fonctionnant sous forme d'hétérodimères et/ou avec une activité catalytique plus importante pour augmenter la spécificité des ZFNs.

Bien que les ZFNs soient en théorie capables de cibler n'importe quelle séquence ADN grâce à la modulation de l'assemblage des domaines de fixation, il n'existe pas de collections de ZFNs reconnaissant toutes les combinaisons de triplets possibles. De plus, toutes les paires de ZFNs ne possèdent pas d'activité de clivage efficace *in vitro*. On considère qu'il existe une cible potentielle tous les 100 pb environ²⁶¹. La fixation et le clivage sont également influencés par le contexte des ZFPs et par des facteurs épigénétiques comme une modification de l'état de condensation de la chromatine²⁶³. Enfin, il s'agit d'une technologie compliquée et longue à mettre en œuvre pour des laboratoires non spécialisés²⁵⁹. Bien que disponibles commercialement, leur cout et l'existence de brevets limitent leur utilisation.

4.3.1.3.Les TALE nucléases

Les protéines TALEs sont, à l'origine, des facteurs de virulence sécrétés naturellement par le pathogène Xanthomonas. Introduits dans le génome de la cellule hôte, ces facteurs régulent la transcription de l'expression de gènes impliqués dans le développement de la pathologie. Le développement de la technologie des TALE nucléases est relativement récent²⁷³ et a été permis par le déchiffrage de leur code de reconnaissance à l'ADN^{274,275}.

Le domaine de reconnaissance spécifique à l'ADN est composé de domaines répétés de 33-35 acides aminés très conservés à l'exception des résidus 12 et 13 hypervariables (RVDs, *repeat variable diresidue*)^{259–262,264,276}. Ces résidus sont contenus dans une structure en boucle qui sépare la TALE en deux hélices α stabilisée par le résidu 12. Le résidu 13 permet la reconnaissance spécifique d'un nucléotide²⁶². Chaque RVD reconnait donc une base de l'ADN et l'assemblage de plusieurs domaines répétés permet alors la reconnaissance d'une séquence spécifique de l'ADN (Figure 15). Chaque protéine TALE diffère par le nombre de monomères, en général 15.5-19.5²⁷⁶, leur nature et de leur arrangement. Le code de reconnaissance « 1 domaine de la TALE = 1 nucléotide » permet une plus grande flexibilité pour la construction des TALEs. Il existerait une limitation à cette flexibilité : la nécessité d'une thymidine en position 5' de la séquence ciblée, bien que celle-ci reste controversée²⁶⁴. De nouveaux variants permettent de s'affranchir de cette « règle »²⁶¹.



Figure 15 : Représentation schématique d'une paire de TALE nucléases²⁶¹.

Le développement des TALE nucléases a profité de celui de la technologie des ZFNs²⁵⁹. Ainsi, les différents variants du domaine catalytique de Fokl ont été adaptés aux TALEs. Les TALE nucléases comme les ZFNs fonctionnent donc à l'état de dimères et l'espacement entre les sites de fixation à l'ADN est également crucial. Une distance de 10-30 pb semble optimale^{262,264}.

En théorie, les TALE nucléases peuvent cibler n'importe quelle séquence d'ADN. Cependant, les TALE nucléases conventionnelles sont incapables de cliver une séquence contenant des cytosines méthylées. Ces cytosines étant non distinguables d'une thymidine, le remplacement de la base permet de contourner cette restriction²⁶¹. Si les TALE nucléases sont plus simples et plus flexibles d'utilisation, la présence de nombreuses séquences répétées induit des phénomènes de recombinaison compliquant leur clonage. Comme pour les ZFNs, l'activité catalytique des TALE nucléases dépend de différents facteurs comme l'accessibilité à la séquence ciblée ou la position et le contexte des mésappariements qui peuvent affecter la reconnaissance.

4.3.2. Le système CRISPR-Cas

Le système CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)-Cas (*CRISPR associated*) appartient à la famille des RGNs et est dérivé du système de défense des bactéries et des archées contre les pathogènes viraux^{277–280}. En 1987, Ishino *et al.*²⁸¹ décrivent la présence de segments répétitifs inhabituels à proximité de gènes bactériens. Ces séquences furent tout d'abord considérées comme des éléments sans réelle valeur jusqu'à ce que plusieurs groupes de recherche montrent qu'ils correspondaient en réalité à

des séquences issues de phages ou de plasmides. Les mécanismes de protection associés à ces séquences furent décrits il y a une dizaine d'années²⁷⁷. Ils se décomposent en trois phases. La phase d'acquisition permet la reconnaissance et l'intégration de séquences ADN issues de virus ou de plasmides entre deux séquences répétées au sein du locus CRISPR. Ces séquences servent de mémoire à la cellule²⁷⁸. Lors de la phase d'expression, la transcription du locus CRISPR génère un pre-crARN qui est ensuite clivé par des endoribonucléases spécifiques pour donner des crARN. Enfin, durant la phase d'interférence, les crARN matures sont incorporés dans un complexe protéique associé au CRISPR (complexe Cas) qui reconnait les séquences des plasmides exogènes grâce à la complémentarité de séquence et les dégrade.

Il existe trois types de système CRISPR-Cas qui se distinguent par leur phylogénie, la conservation de leurs gènes, l'organisation du locus et son contenu^{277,279}. Les types I et III sont présents chez les bactéries et les archées tandis que le type II est présent chez les bactéries uniquement. Les systèmes de type II sont les plus étudiés à ce jour. Ils se caractérisent notamment par l'expression d'une protéine Cas spécifique : la protéine Cas9. Devant le potentiel de reconnaissance et de clivage de ce système, plusieurs équipes de recherche ont cherché à l'adapter à l'édition ciblée de gènes.

La protéine Cas9 est une endonucléase permettant une CDB guidée par un crARN^{277,279,280}. Elle contient deux domaines nucléasiques. Le domaine HNH clive le brin complémentaire tandis que le domaine RuvC clive le brin non-complémentaire. Pour que le complexe soit fonctionnel, la protéine Cas9 nécessite la présence d'un crARN (une séquence guide de 20 nucléotides) d'un tracrARN qui reconnait le crARN et forme une structure en boucle reconnue par la protéine Cas9 et d'un motif spécifique en aval du crARN appelé *protospacer adjacent motif* (PAM) (Figure 16). Ce motif est différent selon les protéines Cas et selon l'espèce d'origine. La protéine Cas9 la plus utilisée provient de la bactérie *Streptococcus pyogenes* et reconnait le PAM « NGG ». Ce motif autorise une séquence cible tous les 8 pb environ dans le génome humain. Lorsque la protéine Cas n'est pas fixée à une séquence ADN ou à un crARN, elle se trouve dans une conformation auto-inhibitrice. Des études d'imagerie ont permis de décrire la séquence de reconnaissance et de clivage²⁷⁹. La formation du duplex ADN:ARN a lieu au niveau du PAM. Le complexe vérifie ensuite la complémentarité de

séquence entre l'ADN et le crARN. Si la vérification est positive, elle déclenche l'activation des domaines nucléasiques de la protéine Cas9 et le clivage de la séquence cible 3 pb en amont du PAM. Afin de faciliter l'utilisation du système CRISPR-Cas pour l'édition de gène, un ARN guide (sgARN) correspondant à la fusion du crARN et d'une partie du tracrARN, a été développé²⁸².



Figure 16 : Représentation schématique du complexe CRISPR-Cas9²⁸³.

Le système CRISPR-Cas s'est révélé très performant et a été utilisé pour la modification de différentes cultures cellulaires^{284,285} et de différents organismes (animaux, plantes). Il autorise également le ciblage multiple. Grâce à des modifications apportées à la protéine Cas9, des versions sans activité nucléasique ont été développées auxquelles ont été fusionnés des domaines d'activation ou d'inhibition de la transcription. On parle alors d'interférence CRISPR.

Le système CRISPR-Cas a pu profiter des années de développement de la technologie des ZFNs et des TALE nucléases et possède divers avantages qui ont aussi contribué à son développement extrêmement rapide. La structure sgARN est simple à concevoir, son clonage est rapide et seuls 20 nucléotides suffisent à reprogrammer la spécificité de clivage de l'endonucléase Cas9. La Cas9 ne fonctionnant pas à l'état de dimère, la construction d'une seule molécule est donc nécessaire pour permettre l'introduction d'une CDB à un locus donné. La taille restreinte de ces structures facilite également leur vectorisation. En outre, le système est efficace, robuste, flexible et permet la conduite d'expériences haut-débit. Les plasmides étant disponibles pour la communauté scientifique, il est également très économique.

4.3.3. ZFNs, TALE nucléases ou CRISPR-Cas9?

Le choix entre l'utilisation des différentes nucléases doit prendre en compte les propriétés particulières de chacune des constructions, leurs points forts et leurs points faibles afin de sélectionner la technologie la plus adaptée au projet de recherche²⁶¹. Leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau 3.

	ZFNs	TALE nucléases	CRISPR-Cas9			
Taux de succès*	environ 24%	>99%	>90%			
Taux de mutations	Faible à élevé. Il dépend du type cellulaire et des méthodes d'introduction. Il n'existe pas de règle prédisant l'activité des nucléases. De manière générale ZFNs < TALE nucléases < CRISPR-Cas9					
Taille	environ 1 kpb (×2 pour le dimère)	environ 3 kpb (×2 pour le dimère)	environ 4.5kb			
Présence de séquences répétées	Importantes	Très importantes	Absentes			
Taille de la séquence cible	18-36 pb	30-40 pb	20 pb			
Effets <i>off</i>	Importants	Assez importants mais variables	Variables (nombreux dans le cas d'une mutagénèse dans des cellules humaines, faibles ou quasiment non détéctés chez la souris voire non détéctés chez <i>Arabidopsis</i> ²⁷⁷)			
Cytotoxicité	Moyenne	Faible	Faible			
Coûts et temps de production	Très importants	Importants	Faibles			
Vectorisation	Limitée (séparation des ZFs ou optimisation de codon)	Très limitée	Facile			
Restrictions	Eviter les régions riches en G	Préférer une base T en position 1 de la TALE	Reconnaissance du PAM qui peut limiter le nombre de cibles potentielles (existence de protéines Cas homologues pour contrer ce problème). Reconnaissance possible du PAM « NAG » par Cas9 (activité plus faible)			

*proportion de nucléases induisant une fréquence de mutation supérieure à 0.5% dans les cellules HEK293.

Tableau 3 : Caractéristiques principales des nucléases ZF, TALE et CRISPR-Cas9.

4.3.4. Les voies cellulaires de la réparation des cassures double brin

De manière générale, les CDB sont considérées par la cellule comme une menace. Elles peuvent être à l'origine d'une carcinogénèse, d'aberrations chromosomiques ou d'une apoptose. La détection d'une CDB active une cascade d'évènements cellulaires étroitement liés appelée réponse au dommage de l'ADN ou *DNA-damage response*. Elle induit une activation de points de contrôle du cycle cellulaire, une modification de la transcription et une modification de l'état de condensation de la chromatine afin de permettre la réparation de la CDB ou de promouvoir la mort cellulaire si les dommages sont trop importants. Il existe deux voies de réparation des CDB : la ligation des extrémités non homologues et la recombinaison homologue.

4.3.4.1.La ligation des extrémités non homologues

La NHEJ est la voie de réparation de la majorité des CDB²⁸⁶. Elle ne nécessite pas de matrice homologue pour la réparation. La NHEJ peut être de deux types : la NHEJ canonique ou la NHEJ alternative. Dans les deux cas, elle est sujette aux erreurs de réparation et permet l'invalidation de gène.

La voie canonique correspond à la NHEJ la plus commune (Figure 17). Elle débute par la reconnaissance d'une CDB et la fixation de l'hétérodimère de protéines Ku70/Ku80^{286,287}. La reconnaissance est rapide grâce à la grande affinité de Ku70/Ku80 pour les CDB et à sa grande concentration intracellulaire. La fixation relève d'une interaction non spécifique entre l'hétérodimère et les sucres constituants la double hélice^{287,288}. L'hétérodimère Ku70/Ku80 permet la protection des extrémités d'ADN contre une dégradation nucléotidique et leur stabilisation²⁸⁸. Il forme également un échafaudage pour le recrutement des autres facteurs protéiques de la NHEJ. L'ordre de recrutement de ces facteurs semble assez flexible²⁸⁷.

L'hétérodimère Ku70/Ku80 recrute et active les sous-unités catalytiques des PK ADNdépendantes^{286–288}. Celles-ci jouent un rôle majeur dans la stabilisation du complexe ainsi que dans le déroulement des phases suivantes de la réparation. Généralement, les

extrémités de la CDB ne peuvent pas être liées directement et nécessitent une modification préalable. Plusieurs enzymes sont donc recrutées pour permettre la modification, la résection et le remplissage des extrémités d'ADN²⁸⁷. L'enzyme PNKP contient un domaine kinase qui phosphoryle les extrémités 5'-OH et un domaine kinase qui retire les phosphates aux extrémités 3'. L'aprataxine catalyse l'ablation des groupes adénylates aux extrémités 5' tandis que les enzymes Ku permettent l'excision de sites abasiques. Les enzymes APLF, Artemis et WRN sont responsables de la résection des brins coupés. Le remplissage est réalisé par les polymérases μ et λ .

Le complexe de réparation recrute ensuite les facteurs XRCC4, XLF et la ligase 4 (LIG4) spécifique de la NHEJ²⁸⁹. XRCC4 et XFL forment un filament impliqué dans la stabilisation de la liaison entre les extrémités de la CDB. XRCC4 aurait également un rôle de stabilisation et d'activation de LIG4. Les mécanismes régulant la dissolution du complexe après réparation de la CDB ne sont pas complètement compris. Cependant, des études récentes indiquent la concomitance de plusieurs facteurs notamment la dissociation du dimère Ku70/Ku80 et une modification de l'état de phosphorylation des DNA-PKcs²⁸⁷.





4.3.4.2.La recombinaison homologue

La recombinaison homologue répare les CDB en restaurant la séquence d'ADN d'origine grâce à l'utilisation de la chromatide sœur ou de l'apport d'une séquence homologue exogène²⁸⁹. Elle a lieu au moment des phases S et G2 du cycle cellulaire uniquement^{286,288}.

Les mécanismes de réparation par la voie de la RH sont constitués de plusieurs étapes impliquant une relaxation de l'état de condensation de la chromatine et nécessitant un très grand nombre de facteurs protéiques²⁸⁶ (Figure 18).





La réparation débute par la reconnaissance de la CDB et la fixation du complexe MRN. Ce complexe recrute ensuite les autres facteurs protéiques impliqués dans la RH. Le recrutement de ces facteurs permet la résection des extrémités de la CDB qui génère alors de longues extrémités 3' protubérantes aussi appelées queue 3'. La résection se déroule en deux étapes avec une résection limitée de 50-100 pb dans un premier temps puis son allongement. Une fois formée, la queue 3' est fixée et stabilisée par les protéines RPA qui empêchent la formation d'une structure secondaire au niveau de l'ADN simple brin. La réparation se poursuit par la fixation de la recombinase RAD51 qui génère un filament nucléoprotéique. Ce filament cherche et envahit alors un duplex de matrice ADN homologue à la queue 3' formant une structure appelée boucle D. L'extrémité du brin 3' « envahisseur » sert d'amorce à l'élongation du brin qui utilise la séquence de la matrice comme copie. Les mécanismes intervenant lors de cette étape de la réparation ne sont pas encore bien caractérisés. Lorsque l'élongation est initiée, deux voies de réparation sont possibles. L'élongation peut se poursuivre sur une distance limitée et la dissociation de la boucle D libère le brin « envahisseur » qui s'apparie avec le brin d'ADNss complémentaire. Le remplissage et la ligation des extrémités permettent de résoudre la CDB. Cette voie est appelée voie SDSA (synthesis-dependent strand annealing). Dans la voie DSBR (double-strand break repair), l'élongation se poursuit plus longuement et la seconde extrémité de la CDB est capturée pour former un intermédiaire appelé jonction de Holliday. La RH se termine par la résolution ou la dissolution de cette jonction.

4.4. Outils du transfert de gène

Le transfert de gène consiste à faire pénétrer une nouvelle information au sein d'une ou plusieurs cellules ou d'un tissu sous forme d'acides nucléiques. Cependant, la taille et la charge négative de ces derniers réduisent considérablement les possibilités de transfert via les membranes cellulaires et nucléaires. Les acides nucléiques rencontrent plusieurs barrières : dégradation par les nucléases, réaction immunitaire, passage de la bicouche lipidique, dégradation endosomale ou lysosomale, dégradation par les enzymes cytoplasmiques ou encore passage de la membrane nucléaire^{291,292}. L'utilisation de vecteurs permet de faciliter le transport des acides nucléiques et d'assurer leur protection. Les vecteurs sont répartis en deux catégories : les vecteurs non-viraux et les vecteurs viraux.

4.4.1. Vecteurs non-viraux

Les méthodes physiques de transfert non-viral regroupent l'électroporation, la technique du pistolet à gène ou gene gun, les ultra-sons ou l'injection hydrodynamique²⁹³. L'électroporation utilise des impulsions électriques contrôlées qui destabilisent temporairement la membrane des cellules cibles facilitant ainsi le passage de la molécule d'ADN. Cette technique a été appliquée avec succès à différents types cellulaires et tissus mais son utilisation reste limitée pour des surfaces de transfert importantes. De plus, le champ électrique peut endommager de manière irréversible les membranes des cellules les plus fragiles. Le gene gun utilise des métaux biocompatibles (or, argent, tungstène) servant de particules de transport. Les molécules d'ADN sont adsorbées sur ces particules métalliques et pénètrent la cellule grâce à une accélération fournie par la vaporisation d'eau ou une décharge d'hélium. Malgré une expression du transgène forte et rapide et l'accessibilité de nombreux organes, cette technique possède une faible efficacité. Pour la technique des ultra-sons, des pores sont créés dans la membrane cellulaire grâce aux ondes sonores et laissent passer les acides nucléiques. L'injection hydrodynamique est quant à elle surtout utilisée pour les organes internes, notamment le foie, et consiste à l'injection d'un fort volume d'une solution d'ADN en un temps très limité afin de forcer le passage à travers les membranes.

Les méthodes chimiques de transfert non-viral cherchent à masquer les charges négatives de l'ADN, à compresser la molécule d'ADN et à la protéger durant son transport. Ces méthodes utilisent les lipoplexes, les polyplexes, l'encapsulation d'ADN ou encore les nanoparticules lipidiques solides^{291–293}. Les lipoplexes et les polyplexes sont les outils de transfert non-viral les plus utilisés. Ils sont formés par l'interaction électrostatique entre l'ADN anionique et des polymères (polypeptides, polysaccharides) ou des polycations respectivement. Il existe plusieurs formulations de lipoplexes (DOTMA, DOTAP, DMRIE, DC-cholestérol, DOGS, DOSPA) et de polyplexes (PDMAEMA, PEI linéaire ou ramifié, PPI, PLL, PAMAM). Un inconvénient majeur à leur utilisation réside dans la cytotoxicité de leurs charges positives. L'encapsulation d'ADN utilise des polymères biodégradables. Plusieurs stratégies sont possibles : micelles de copolymères, émulsion inversée ou encore liposomes. Ils présentent

l'avantage d'être facilement éliminés de l'organisme mais nécessitent des conditions de préparation très strictes.

Bien que ces vecteurs présentent divers avantages (faible toxicité, faible immunogénicité, production facile et peu couteuse, grande capacité), l'expression du transgène est transitoire et leur efficacité de transfert reste largement inférieure à celle des vecteurs viraux.

4.4.2. Vecteurs viraux

La technique du transfert viral est la plus efficace et utilise les propriétés infectieuses des virus notamment leur capacité à introduire efficacement leur génome dans les cellules cibles. Afin de pouvoir les utilser de façon contrôlée et sure, les génomes viraux ont fait l'objet de modifications afin d'éliminer les gènes permettant leur réplication et de conserver uniquement ceux permettant l'infection et la délivrance de l'information génétique (ADN ou ARN viraux). On parle alors de vecteur viraux. Les vecteurs viraux les plus utilisés sont issus des rétrovirus (oncorétrovirus et lentivirus), des adénovirus ou des adénovirus associés (AAV, *adeno-associated virus*). Leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau 4. Du fait de leurs propriétés particulières, les vecteurs lentiviraux ont été choisis pour transférer les outils qui permettront l'invalidation du gène *CFTR* dans les cellules épithéliales respiratoires humaines, et plus particulièrement les vecteurs lentiviraux dérivés du HIV-1.

Le virus HIV-1 sauvage comporte un génome à ARN simple brin d'environ 9 kb codant pour neuf protéines virales dont les trois plus importantes sont *Gag* qui correspondent aux protéines du cœur, *Pol* qui correspondent aux enzymes de réplication, et *Env* qui correspondent aux glycoprotéines de surface. Les protéines *Tat* et *Rev* sont des protéines de régulation. La protéine *Tat* permet une amplification de la transcription, tandis que la protéines restantes correspondent aux protéines accessoires *Vif, Vpr, Vpu* et *Nef*. Le génome viral est encadré par deux séquences LTR (*Long Terminal Repeat*). Chaque LTR contient les régions U5, R et U3. Les régions U3 sont des régions promotrices et activatrices de la transcription.

	Vecteurs	Vecteurs	Vecteurs	Voctours AAV	
	oncorétroviraux	lentiviraux	adénoviraux		
Famille	Retroviridae		Adenoviridae	Parvoviridae	
Type de virus	Enveloppé		Non enveloppé	Non enveloppé	
Génome viral	Double molécule d'ARN de 7-12 kpb		ADN double brin linéaire d'environ 40 kpb	ADN simple brin de 4.7kpb ADN double brin pour les vecteurs self complementary	
Séquences virales	2séquencesLTR(LongTerminalRepeats)constituées des régionsU3, R et U5, gèneenvcodantpourlesglycoprotéinesd'enveloppe,gèneGagcodantpourlesprotéinesd'assemblage,gènePolcodantpourlesenzymesnécessaires à la réplicationviraleGènesTat,RevetVifpourlesprotéinesrégulatricesetaccessoiresaccessoiresetaccessoires		2 séquences ITR (<i>inverted Terminal</i> <i>Repeats</i>), unités de transcription précoces (E1-E4), intermédiaires (IX, Iva2) et tardives (L1- L5)	2 séquences ITR (<i>inverted</i> <i>Terminal Repeats</i>), gène <i>rep</i> pour la réplication et la régulation, gène <i>cap</i> codant la capside Nécessite la présence d'un virus auxiliaire pour se répliquer	
Cellules cibles	En division	En division ou quiescentes	En division ou quiescentes	En division ou quiescentes	
Intégration au génome hôte	Oui		Non	Possible	
Sérotypes / Protéines		Généralement	>50 sérotypes identifiés	11 sérotypes naturels et	
d'enveloppe		pseudotypés avec VSG-G	mais souvent 2 ou 5	>100 variants	
Tropisme	La	rge	Large	Selon le sérotype	
Immunogénicité	Fai	ble	Forte	Faible	
Production	Titres faibles à élevés		Titres élevés (10 ¹² -10 ¹³ particules)	rés (10 ¹² -10 ¹³ Titres élevés (10 ¹² -10 ¹³ cicules) particules)	

Tableau 4 : Propriétés et caractéristiques des vecteurs viraux utilisés dans le cadre du transfert de gène^{291,294–296}.

La région R de la LTR 3' stabilise les transcrits grâce au signal de polyadénylation. Avant intégration au génome de la cellule hôte, l'ARN viral est rétro-transcrit et les séquences LTR sont dupliquées. En aval de la LTR 5' se trouve un signal d'encapsidation des transcrits non épissés, le signal Ψ , ainsi qu'un site d'amorçage de la rétro-transcription. En amont de U3 se trouve une séquence PPT (*polypurine tract*) qui permet la syntèse du brin positif. Après transcription inverse, il y a intégration dans le génome de la cellule hôte. Chaque particule virale contient deux copies de ce génome (Figure 19)²⁹⁶.



Figure 19 : Génome viral du VIH-1 sauvage²⁹⁶.

La biosécurité des vecteurs constitue un des enjeux principaux du transfert viral. Plusieurs améliorations ont permis de répondre à ces questions notamment la séparation des composants du génome viral, la modulation des glycoprotéines d'enveloppe ou la délétion de séquences promotrices et activatrices dans les vecteurs SIN. La plupart des vecteurs lentiviraux dérivés du HIV-1 sont issus des vecteurs de deuxième ou troisième génération. Les vecteurs de première génération furent les premiers vecteurs recombinants nonréplicatifs. Pour cela, la production des particules virales est réalisée à partir de trois éléments séparés. Un plasmide d'assemblage code pour les protéines Gag, Pol et les protéines de régulation et accessoires. Le plasmide d'enveloppe code pour les glycoprotéines de surface. Du fait de leur large tropsime, les glycoprotéines G du virus vesicular stomatitis virus (VSV-G) sont largement utilisées²⁹⁷. Les glycoprotéines d'enveloppe peuvent être adaptées en fonction de la cible cellulaire. Ces deux premiers plasmides ne contiennent pas de séquence LTR ni de signal d'assemblage. Enfin, le troisième plasmide code le génome viral. Il contient le transgène d'intérêt et les éléments essentiels LTR, Ψ et RRE (Rev responsive element) en cis. Ce plasmide n'exprime aucune protéine du HIV-1. Les protéines accessoires Vif, Vpr, Vpu et Nef sont absentes des vecteurs de deuxième génération (Figure 20). Pour les vecteurs de troisième génération, les gènes Tat et Rev sont apportés dans un quatrième plasmide séparé. Le vecteur viral ne contient alors plus que trois des neuf protéines virales, ce qui permet une augmentation de la biosécurité par rapport aux générations précédentes²⁹⁶. Les vecteurs SIN contiennent des délétions dans la région U3 de la LTR 3'. Lors de la formation des LTRs pendant la transcription inverse, les séquences U3 et U5 sont dupliquées. Les copies présentent dans l'ARN viral servant de modèle pour la formation des deux LTRs, les délétions permettent d'inactiver la séquence de transcription du génome viral, prévenant ainsi des effets de dérégulation des gènes présents dans la zone d'intégration et une possible expression du génome viral complet. Au sein du génome, plusieurs éléments ont été ajoutés pour augmenter l'expression du transgène d'intérêt et optimiser les étapes qui conduisent à son intégration. Par exemple, la séquence cPPT (*central PPT*) augmente l'efficacité de transduction *in vitro* et *in vivo* en améliorant la transcription inverse et l'adressage du vecteur vers le compartiment nucléaire. L'élément WPRE (*Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element*) permet une meilleure expression du transgène une fois intégré au génome de la cellule hôte grâce à une maturation optimale des ARNm et à une meilleure polyadénylation²⁹⁶.



Figure 20 : Vecteur lentiviral dérivé du VIH-1 SIN de 2^{nde} génération utilisé dans ce projet²⁹⁶.

Une autre préoccupation concerne le risque de mutagénèse insertionnelle reposant sur le virus lui-même et sur son profil d'intégration semi-aléatoire, préférentiellement dans les unités de transcrpition dans les régions génomiquement denses. Cependant, malgré une forte efficacité de transduction, les études récentes n'ont pas montré de problème particulier lié à l'utilisation des vecteurs lentiviraux.

Enfin, le développement d'une réponse immunitaire contre le vecteur et/ou le transgène peut impacter de façon significative l'efficacité du transfert viral *in vivo*. Ces antigènes étrangers peuvent déclencher une réponse innée via l'activation de cellules non-spécifiques qui entraine la sécrétion de cytokines proinflammatoires, mais également activer les cellules présentatrices des antigènes qui déclenchent une réponse adaptative. Celle-ci est l'obstacle majeur pour l'expression du transgène *in vivo* à long terme.

OBJECTIFS DE LA THESE

La mucoviscidose est une maladie multiviscérale mais l'atteinte respiratoire sévère est la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients. Elle est caractérisée par une infection chronique des voies aériennes, une inflammation délétère et une destruction progressive de l'épithélium respiratoire. Cependant, la séquence des évènements et de la mise en place d'un tel phénotype au cours des premières années de vie fait encore débat.

Historiquement, l'inflammation délétère observée chez les patients CF est décrite comme résultant d'infections répétées évoluant vers une infection chronique, qui stimulent la réponse inflammatoire naturelle de l'organisme. Face à ces cycles répétés d'infection et d'inflammation, l'épithélium ne parvient pas à se reconstituer parfaitement. Pourtant, il existe des indications d'une inflammation précoce sans signe clinique apparent d'une infection déclarée dans les voies respiratoires de très jeunes patients CF. Se pose alors la question d'un rôle direct potentiel du gène *CFTR* muté dans la mise en place de ces symptômes. Comme rapporté dans l'introduction de ce travail de thèse, il existe des indices qui impliquent un défaut d'expression et/ou de fonctionnalité du canal CFTR dans la susceptibilité des voies aériennes aux pathogènes (notamment *P. aeruginosa*), dans la réponse inflammatoire plus ou moins appropriée et efficace, et dans la réparation cellulaire d'un épithélium fonctionnel. Ces descriptions et hypothèses proviennent de l'observation et de l'étude des prélèvements réalisés chez les patients, mais également des nombreuses études menées grâce aux modèles cellulaires et animaux de la mucoviscidose.

Les modèles animaux CF ont l'avantage particulier de permettre l'étude des mécanismes *in vivo* dans le contexte d'un organisme entier. Cependant, concernant l'atteinte respiratoire de la maladie, les modèles murins ont montré certaines limites liées notamment à l'absence d'un phénotype spontané et à des différences morphologiques notoires. Les premières observations réalisées dans les modèles CF récemment développés chez le cochon et le furet sont prometteuses et la caractérisation de ces animaux devrait apporter un éclairage nouveau à certains mécanismes. Les modèles cellulaires CF et non-CF quant à eux permettent l'étude de mécanismes ou de réponses particulières dans un environnement « isolé » sur des échelles de temps souvent réduites par rapport aux études *in vivo*, et ont largement contribué à la compréhension de la pathologie. Néanmoins, les résultats obtenus et hypothèses avancées peuvent être contradictoires et dépendent largement des lignées,

Objectifs de la thèse

des types de culture, de leur provenance dans le cas de cultures primaires ou encore des conditions d'expérimentation. A propos de modèles mathématiques empiriques, Georges Box et Norman Draper remarquaient : « Essentially, all models are wrong, but some are useful »²⁹⁸. Cette observation peut également s'appliquer aux modèles de la mucoviscidose. S'il n'existe pas de modèle parfait, certains peuvent être développés afin de répondre au mieux à une problématique particulière. *In vitro*, la culture de cellules primaires sur support semi-perméable permet l'obtention d'épithéliums pseudo-stratifiés mucociliés et présente les caractéristiques les plus proches de l'épithélium respiratoire *in vivo*. Un des inconvénients majeurs réside dans la provenance de cultures CF. En effet, le génotype et le phénotype des patients sont souvent très variables. Concernant l'atteinte respiratoire, la présence d'infections bactériennes plus ou moins installées peut compromettre la qualité des prélèvements (certaines contaminations conduisent à l'échec de la culture) et les traitements reçus peuvent également influencer la culture et les résultats selon l'étude réalisée. De plus, il n'existe pas de contrôle isogénique qui peut être utilisé en parallèle et l'influence des gènes modificateurs reste difficile à évaluer.

La modification génétique de cellules issues d'une même source constitue une solution à ce problème particulier. Si l'expression exogène du *CFTR* est tout à fait envisageable et a déjà été réalisée, l'expression n'est pas physiologique et pourrait conduire à des biais expérimentaux. A l'inverse, plusieurs techniques permettent l'invalidation de gène dans des cellules saines. En 2013, Ramachandran *et al.* ont publié un protocole d'invalidation du gène *CFTR* utilisant des siRNA dans des cellules épithéliales respiratoires humaines primaires permettant l'obtention d'un épithélium différencié CF²⁹⁹. Cependant, ce protocole ne permet pas une invalidation stable dans des cellules en division et n'est donc pas adapté à certaines études, par exemple celles de réparation qui nécessitent une prolifération cellulaire.

Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse a consisté en la mise au point de nouveaux modèles cellulaires de la mucoviscidose dans des cellules épithéliales respiratoires humaines grâce à l'utilisation de deux techniques d'invalidation permettant l'inhibition stable du gène *CFTR* : l'interférence ARN *via* des séquences shRNA et l'édition de gène par les endonucléases artificielles de type CRISPR-Cas9. La conception, la sélection et l'amélioration des outils moléculaires utilisés pour ce projet ont été réalisées au sein du groupe du Dr Tuan Huy Nguyen à Nantes (U1064). La mise en place du protocole de modification des cellules primaires et la caractérisation des modèles CF générés ont été menées au sein de l'équipe du Dr Marc Chanson à Genève. Ces modèles permettront l'étude des conséquences de l'invalidation du gène *CFTR* sur les voies de signalisation impliquant la sécrétion d'IL-8 et sur la migration et la prolifération cellulaire lors de la réparation de l'épithélium. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'un article scientifique soumis à la revue *Current Gene Therapy* et présenté dans la partie « Résultats et Conclusions ».

Nos outils ont également été appliqués à d'autres cibles génétiques. En effet, le Dr Marc Chanson et son équipe travaillent sur les liens entre le canal CFTR et les protéines de jonction intra-cellulaires appelées connexines dans le contexte de la mucoviscidose. Nos outils d'invalidation par la méthode de l'interférence ARN ont été utilisés pour cibler les connexines 43 et 26 dans la lignée cellulaire glandulaire Calu-3 et dans des cellules primaires. Les résultats obtenus sont décrits dans les articles de Losa *et al.* et Crespin *et al.* disponibles en Annexes 1 et 2.

RESULTATS ET CONCLUSIONS

1. <u>Développement des outils moléculaires pour la génération de lignées</u> <u>cellulaires Calu-3 immortalisées et d'épithéliums primaires respiratoires</u> différenciés invalidés pour le gène *CFTR*

1.1. Matériels et Méthodes

Culture cellulaire

La lignée cellulaire BHK (*Baby Hamster kidney*) exprimant la protéine CFTR (BHK-CFTR, don de G. Lukacs) a été maintenue dans un milieu DMEM/F12 3:1 contenant 10% de sérum de veau fœtal, 1% de L-Glutamine, 1% de pénicilline/streptomycine et de l'aminopterine à une concentration finale de 25µM (sélection des cellules exprimant le *CFTR*).

La lignée cellulaire Calu-3 (HTB-55TM) provient de l'*American Type Culture Collection* (ATCC) et a été cultivée dans un milieu MEM contenant 10% de sérum de veau fœtal, 1% d'acides aminés non-essentiels, 1% de pyruvate de sodium et 1% de pénicilline/streptomycine. Les cellules Calu-3 (1-1.5×10) ont été polarisées après ensemencement sur des inserts en polyester poreux (0.4µm) de type Transwell (3470, Corning Life Science) d'une surface de 0.33 cm² et culture en conditions submergées pendant 14-20 jours.

La lignée cellulaire HEK293T provenant de l'ATCC a été cultivée dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal, 1% de L-Glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine.

Sélection de séquences siRNA CFTR-spécifiques

La recherche de séquences siRNA ciblant l'ARNm CFTR a été effectuée sur la séquence entière de l'ARNm (NM_000492.3) en utilisant le programme disponible sur le site de GenelinkTM (www.genelink.com/sirna/shrnai.asp) avec les critères de recherche suivants :

- commencer la séquence par NN (avec N = A, T, G ou C)
- 40-50% de bases G/C
- exclure les séquences NNN
- longueur de la séquence : 23pb

Constructions plasmidiques

Trois séquences siRNA ciblant l'ARNm CFTR (séquence 1: 5'-TTGGATGACCTTCTGCCTCTTAC-3', 5'-AACAACAGGAGAAGGAGAAGGAA-3' 5'séquence2 et séquence 3: : GATAGAAAGAGGACAGTTGTTGG-3') et une séquence non-spécifique (Alter: 5'-GATAGAAAGGATTGACAGTGGTG-3') ont été intégrées dans la structure suivante, 5'-CGCGTCCCC-siRNA sens-TCAAGAG-siRNA anti-sens-TTTTTGGAAAT-3', pour former des séquences shRNA. Ces oligonucléotides ont ensuite été clonés dans le plasmide lentiviral pLVTHM (Addgene 12247, don de D. Trono, EPFL, Suisse) entre les sites de restriction Mlul et *Clal* afin d'obtenir les constructions plasmidiques sh1, sh2 et shAlter.

Une cassette d'expression a également été conçue pour exprimer les trois séquences shRNA décrites ci-dessus sous contrôle des promoteurs H1, U6 et 7SK. Cette cassette d'expression a été produite par Genecust et fournie sous la forme du plamside « pUC57 sh1-U6-sh2-7SK-sh3 ». Le transgène sh1-U6-sh2-7SK-sh3 a ensuite été cloné dans le plasmide lentiviral pLVTHM entre les sites de restriction *Mlul* et *Clal* afin d'obtenir la construction plasmidique Triple.

La cassette d'expression Cas9-HA-GFP contenue dans le plasmide pMJ920 (Addgene 42234) a été clonée sous contrôle du promoteur SFFV (spleen focus-forming virus) dans le vecteur lentiviral RRLSIN-cPPT-SFFV-GFP-WPRE (don de Els Verhoyen, INSERM U1111, France) pour obtenir le plasmide contrôle CTL. Deux séquences de la forme « N₁₉NGG » et ciblant l'exon 2 du gène CFTR (TSJB1: 5'-CACCGAAAGGATACAGACAGCGCC-3' et TSJB2: 5'-CACCGGTATATGTCTGACAATTCC-3') ont été clonées dans le plasmide pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene 42230) entre les sites de restriction BbsI. Chacune des deux cassettes d'expression pU6-sgRNA contenant une séquences cible correspondant aux nucléotides 117 504 274 à 117 504 296 (TSJB1) et 117 504 292 à 117 504 314 (TSJB2) du gène CFTR ont été amplifiées par PCR et clonées dans le plasmide CTL afin d'obtenir les constructions plasmidiques TSJB1 et TSJB2.

Transfection dans les cellules BHK-CFTR, Calu-3 et HEK293T

Les cellules BHK-CFTR (5×10⁴) ont été ensemencées dans une plaque 24-puits 24 heures avant transfection. Le milieu a été remplacé le jour suivant. Les cellules ont été transfectées en duplicat avec les oligonucléotides siJB19, siJB28, siJB35, siJB50, siJB66 et siDav (10-50 pmol) et le réactif Lipofectamine RNAimax (1µL). Du milieu seul ou contenant de la Lipofectamine diluée a été utilisé comme contrôle négatif. Trois jours post-transfection, les cellules ont été récoltées et les duplicats ont été poolés. Les culots cellulaires ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à l'extraction protéique pour l'analyse par Western blot.

Les cellules Calu-3 (3×10^5) ont été transfectées avec les oligonucléotides siJB35, siJB50 et siDav (10-50 pmol) et le réactif Lipofectamine RNAi max (3μ L) en ajoutant la solution de transfection au moment de l'ensemencement dans une plaque 48-puits²⁹⁹. Le milieu a été remplacé 24 heures plus tard. Trois jours post-transfection, les cellules ont été récoltées directement dans les puits avec un tampon de solubilisation des protéines.

Les cellules HEK293T (3×10⁵) ont été ont été ensemencées dans une plaque 12-puits 24 heures avant transfection. Le milieu a été remplacé le jour suivant. Les cellules ont été cotransfectées avec les plasmides exprimant deux paires de TALE nucléases (deux plasmides/paire) ou transfectées avec les plasmides du système CRISPR-Cas9 et le réactif Lipofectamine 2000 (1.5µL). Du milieu seul ou contenant de la Lipofectamine diluée a été utilisé comme contrôle négatif. Trois jours post-transfection, les cellules ont été récoltées et les culots cellulaires ont ensuite été conservés à -20°C pour analyse par Western blot et détection de l'activité nucléasique par l'enzyme T7E1.

Production de vecteurs lentiviraux dérivés du HIV-1

Les vecteurs lentiviraux dérivés du HIV-1 ont été produits grâce à la méthode de transfection triple avec du phosphate de calcium. Des cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide lentiviral d'intérêt, le plasmide d'assemblage psPAX2 (Addgene 12260) et le plasmide codant pour les protéines d'enveloppe VSV-G pMD2.G (Addgene 12259). Le milieu a été remplacé 18 heures post-transfection. Pour la production des stocks viraux pour le

système CRISPR-Cas9, du butyrate de sodium (10mM) a été ajouté au milieu. Les surnageants contenant les particules lentivirales ont été récoltés 24 heures plus tard et concentrés à 10 000 rpm et 4°C pendant 18-20 heures. Les particules virales ont ensuite été resuspendues dans du milieu *advanced* DMEM et conservées à -80°C.

Les concentrations des stocks viraux ont été déterminées par cytométrie de flux après transduction de cellules HeLa avec des dilutions sérielles de vecteur concentré. Le titre a été calculé selon la formule suivante : ((% de cellules GFP/100) × nombre de cellules au moment de la transduction × facteur de dilution)/volume, et exprimé en ^{HeLa}transducing units (TU)/mL. Les titres étaient compris entre 10⁷ et 10^{9 HeLa}TU/mL selon le transgène d'intérêt.

Analyse en cytométrie de flux et tri cellulaire

L'analyse en cytométrie de flux des cellules transduites avec les vecteurs lentiviraux dérivés du HIV-1 a été réalisée avec un FACS Cantoll en utilisant le logiciel BDFacsDiva (BD Biosciences). Les pourcentages de cellules exprimant la GFP ont été déterminés grâce au logiciel FlowJo.

Le tri des cellules exprimant la GFP a été réalisé avec un FACS Aria (BD Biosciences) ou par la plateforme de cytométrie de flux des Hopitaux Universitaires de Genève (Suisse) afin de générer des lignées immortalisées de cellules Calu-3 exprimant une ou plusieurs séquences shRNA ou le système CRISPR-Cas9.

Détection des mésappariements par l'enzyme de restriction T7E1

L'ADNg des cellules à analyser a été extrait en utilisant un protocole d'extraction au phénolchloroforme et quantifié avec le spectrophotomètre NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific). La pureté des échantillons a été évaluée grâce aux ratios A260/A280 et A260/A230.

Résultats et conclusions

L'activité nucléasique des TALE nucléases et des séquences sgRNA au niveau du site cible a été quantifiée grâce à l'enzyme de restriction T7E1. La séquence d'ADN d'intérêt a tout d'abord été amplifiée par PCR en utilisant la polymérase Taq Platinum HiFi (InvitrogenTM, Life Technologies), l'amorce sens 5'-TGTAGCCTGTAAGAGATGAAGC-3' et l'amorce anti-sens 5'-CAATCCTCTCATCTTGGCCTC-3'. Le produit de PCR (451 pb) a ensuite été dénaturé puis lentement ré-hybridé (95°C, 2 minutes ; 95°C à 85°C, -2°C/sec ; 85°C à 25°C, -1°C/sec) pour obtenir un mélange d'homoduplexes et d'hétéroduplexes. Ce mélange a ensuite été digéré par l'enzyme de restriction T7E1 (3 unités) à 37°C pendant 30 minutes. Cette enzyme de restriction clive l'ADN lorsqu'elle reconnait des mésappariements de base. Enfin, les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse et l'activité de modification a été calculée grâce au logiciel ImageJ selon la formule suivante : $\% = 100 \times (1 - (1 - Fc)^{0.5})$, avec Fc = a/(a+b) où a est l'intensité des bandes clivées et b est l'intensité des bandes non-clivées.

Western blot

Les protéines ont été extraites par incubation dans du tampon de solubilisation (65mM Tris, 150mM NaCl, Nonidet-P40 1%, protease inhibitor mix 1X (Roche)) pendant 30 minutes à 4°C. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 10 000×g et 4°C pendant 15 minutes. Après récolte, les surnageants ont été conservés à -20°C jusqu'au moment de leur utilisation. La concentration en protéine a été quantifiée par analyse à l'acide bicinchoninique (Pierce, Thermo Fisher Scientific). Pour chaque échantillon, une quantité égale de protéine a été séparée sur gel d'acrylamide puis transférée sur une membrane de fluor de polyvinylidène ou de nitrocellulose grâce à la technique du transfert semi-sec. La membrane a ensuite été saturée dans un tampon TBS-T (20mM Tris, 140mM NaCl, Tween-20 0.1%) contenant 5% lait écrémé pendant une durée d'au moins une heure, à température ambiante et sous agitation.

Pour la détection de la protéine CFTR, la membrane a tout d'abord été incubée avec un anticorps monoclonal de souris anti-hCFTR (C-Terminus clone 24.1, MAB25031, R&D Systems) ou un anticorps monoclonal de souris anti-GAPDH (clone 6C5, MAB374, Millipore) dilués au 1/1 000 et au 1/2 000, respectivement, dans du tampon TBS-T contenant 1% de lait écrémé. La membrane at ensuite été incubée avec un anticorps polyclonal de chèvre

anti-souris conjugué à l'HRP (*Horse Raddish Peroxidase*) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) et révélée en utilisant le kit *SuperSignal West Pico* (Pierce, Thermo Fisher Scientific). L'intensité des bandes a été quantifiée grâce au logiciel ImageJ. L'expression de la protéine CFTR a été normalisée à celle de la GAPDH.

Pour la détection du tag HA, la membrane a tout d'abord été incubée avec un anticorps monoclonal de souris anti-HA conjugué à la biotine ou un anticorps de souris anti-tubuline dilués au 1/2 000, dans du tampon TBS-T contenant 1% de lait écrémé. La membrane a ensuite été incubée avec un anticorps HRP-streptavidine ou un anticorps polyclonal de chèvre anti-souris conjugué à l'HRP et révélée en utilisant le kit *SuperSignal West Pico* (Pierce, Thermo Fisher Scientific). L'intensité des bandes a été quantifiée grâce au logiciel ImageJ. L'expression de la protéine HA a été normalisée à celle de la tubuline.

Electrophysiologie

La mesure des courants de court-circuit transépithéliaux en chambre d'Ussing (Physiologic Instruments) a permis d'évaluer la fonction du canal CFTR. Le compartiment basolatéral était baigné dans une solution Krebs contenant 134mM NaCl, 4.8mM KCl, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄-7H₂O, 5mM NaHCO₃, 2.5mM CaCl₂, 10mM Hepes et 1mM glucose (pH 7.4). Le compartiment apical était baigné dans une solution Krebs contenant 119mM Na gluconate, 15mM NaCl, 4.8mM K gluconate, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄-7H₂O, 5mM NaHCO₃, 2.5mM CaCl₂, 10mM Hepes et 1mM glucose (pH 7.4). Pour réaliser les mesures, la différence de potentiel transépithélial a été ramenée à une valeur nulle et le courant de court-circuit résiduel a été mesuré grâce à un amplificateur VCC MC6 (Physiological Instruments). L'interface DI-720 (DataQ Instruments) et le logiciel *Acquire & Analyze 2.3* (Physiological Instruments) ont permis l'acquisition des données. L'activité des canaux ENaCs a été bloquée en ajoutant une solution d'amiloride (concentration finale 100µM) au niveau du compartiment apical. L'activité des canaux CFTR a été stimulée en ajoutant une solution d'IBMX/isoprotérénol (concentrations finales 50µM) dans le compartiment basolatéral.

Analyses statistiques

Les données des graphiques correspondent à la moyenne \pm erreur standard de la moyenne. Les valeurs statistiques ont été calculées avec le logiciel GraphPad Prism et considérées comme significativement différentes pour une valeur p <0.05. Les populations cellulaires ont été comparées en utilisant le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis associé à la méthode de comparaison multiple de Dunn ou le test de Mann-Whitney. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

1.2. Résultats et conclusions

1.2.1. Stratégie de l'interférence ARN et séquences shRNA

1.2.1.1.Sélection et criblage de séquences siRNA ciblant l'ARNm du gène CFTR

Les premières expériences ont été réalisées avec une séquence shRNA ciblant l'ARNm CFTR précédemment publiée par Palmer *et al.* et ayant permis une invalidation quasi-totale dans des cellules Calu-3 modifiées³⁰⁰. Afin de confirmer son potentiel d'invalidation dans notre sytème d'expression avant utilisation dans les cellules primaires, cette séquence a été clonée dans le plasmide pLVTHM et les cellules Calu-3 ont été transduites avec les vecteurs lentiviraux correspondants. L'efficacité d'inhibition de cette séquence a ensuite été déterminée par Western blot. Bien que cette expérience ait validé notre stratégie d'infection et de tri par FACS, l'analyse du contenu protéique a seulement montré une réduction de 20% de l'expression du *CFTR*.

De nouvelles séquences ciblant l'ARNm CFTR ont donc été recherchées et testées pour obtenir un meilleur taux d'invalidation du gène en utilisant le programme disponible sur le site de Genelink[™].

La spécificité des 460 séquences candidates proposées a ensuite été vérifiée grâce à la base de données *Nucleotide BLAST* (blastn). Les 68 séquences spécifiques de l'ARNm CFTR et d'une ou deux séquences non-codantes (hypothétiques ou prédites) ont ensuité été controlées pour la présence de SNPs (*single-nucleotide polymorphisms*) ou d'INDELs (insertions/délétions). Quatre séquences ne présentaient aucune variation de ce type et ont été sélectionnées (JB19, JB28, JB35 et JB50), auxquelles s'est ajoutée une séquence

préalablement sélectionnée au sein de l'équipe du Dr Marc Chanson (Dav). Une dernière séquence localisée dans la partie terminale de l'ARNm CFTR et présentant un SNP a également été considérée. Ces six séquences et leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau 5.

Séquence	Spécificité	Position dans	Nombre de	Position	
Sequence	(blastn)	l'ARNm CFTR	SNPs/INDELs		
Dav : GATAGAAAGAGGACAGTTGTTGG	CFTR mRNA	1473-1495	0	Exon 10	
JB19 : CTGGATTATGCCTGGCACCATTA	CFTR mRNA	1617-1639	0	Exon 11	
JB28 : TGATATGGAGAGCATACCAGCAG	CFTR mRNA	2637-2659	0	Exon 15	
JB35 : TTGGATGACCTTCTGCCTCTTAC	CFTR mRNA +1 hyp. NC*	3079-3101	0	Exon 18	
JB50 : AACAACAGGAGAAGGAGAAGGAA	CFTR mRNA	3492-3514	0	Exons 20+21	
JB66 : TCTCTGTGAACACAGGATAGAAG	CFTR mRNA	4326-4348	1	Exon 26	

*Hyp NC: hypothetical non coding sequence

Tableau 5 : Résultats de la recherche de séquences siRNA ciblant l'ARNm CFTR.

L'efficacité d'invalidation des six séquences siRNA candidates a ensuite été vérifiée par des expériences de transfection dans la lignée BHK-CFTR puis validée dans la lignée des cellules Calu-3 (Figure 21).



Α

<u>Figure 21</u> : Invalidation du gène *CFTR* par des séquences siRNA spécifiques. *Des cellules BHK-CFTR (A) et Calu-3 (B) ont été transfectées avec des oligos siRNA (10-50pmol) et le réactif Lipofectamine. Les cellules ont été lysées trois jours après transfection afin d'analyser le contenu protéique par Western blot. L'expression de la protéine dans les cellules BHK-CFTR a été quantifiée par densitométrie et comparée à celle de cellules non-transfectées (UTC). L'expression de la protéine dans les cellules a été quantifiée par densitométrie, normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage GAPDH, et comparée à celle de cellules non-transfectées (UTC).*

Les séquences JB35, JB50 et Dav ont été sélectionnées pour la suite du projet et renommées respectivement sh1, sh2 et sh3. Chacune de ces séquences a été clonée dans le plasmide pLVTHM (Supplementary figure 1, pages 144-145). Plusieurs équipes de recherche ont montré que l'utilisation de constructions multiples permet d'augmenter l'efficacité d'inhibition de séquences shRNA. Une même séquence peut être répétée ou le plasmide peut contenir des séquences différentes. Un plasmide triple (Triple) a donc été construit dans lequel sont exprimées les trois séquences sh1, sh2 et sh3 sous contrôle de trois promoteurs différents (Figure 22). En effet, la présence de séquences répétées induit des délétions pendant la rétrotranscription lors de la production des particules lentivirales.



Figure 22 : Représentation schématique de la construction shRNA triple.

1.2.1.2. Détermination de la séquence ou de la combinaison de séquences induisant la plus forte invalidation du gène *CFTR*

Afin de déterminer la meilleure séquence shRNA ciblant l'ARNm CFTR ou la meilleure combinaison de séquences, des cellules Calu-3 ont été transduites et co-transduites avec les vecteurs lentiviraux dérivés des constructions simples et de la construction triple (multiplicité d'infection 10 pour chaque vecteur). Les cellules exprimant la GFP ont ensuite triées par FACS afin de créer des lignées immortalisées exprimant stablement la ou les séquences shRNA. Ces cellules ont été ensemencées sur des supports semi-perméables de type Transwell puis cultivées en conditions submergées pendant 14-20 jours. Les courants ioniques transépithéliaux ont alors été mesurés en chambres d'Ussing et le contenu protéique a été analysé par Western blot (Figure 23).



<u>Figure 23</u> : Invalidation du gène *CFTR* par des séquences shRNA spécifiques. *Des lignées immortalisées de cellules Calu-3 exprimant une ou plusieurs séquences shRNA spécifiques du CFTR ont été générées par transduction et tri des cellules exprimant la GFP par FACS puis cultivées sur supports semi-perméables. (A) Les courants transépithéliaux ont été mesurés en chambre d'Ussing après activation des canaux CFTR suite à l'augmentation de la concentration intra-cellulaire d'AMPc. Les variations de courants reflètent l'état fonctionnel du canal CFTR. (B) L'expression de la protéine CFTR dans les cellules Calu-3 a été quantifiée par densitométrie, normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage GAPDH, et comparée à celle de cellules exprimant une séquence shRNA aspécifique (shAlter).*
Seule la combinaison des séquences sh1 et sh2 a permis d'obtenir une inhibition de l'expression protéique corrélée à une inhibition fonctionnelle du canal CFTR. Cette combinaison a donc été sélectionnée pour la poursuite du projet.

1.2.2. Stratégie d'édition du gène CFTR et endonucléases artificielles

1.2.2.1.Génotypage

Pour le design de TALE nucléases puis de séquences cibles sgRNA pour le système CRISPR-Cas9, des régions d'environ 2 kpb encadrant l'exon 2 du gène *CFTR* ont été séquencées à partir de l'ADN de dix patients sains suisses (pays de provenance des biopsies utilisées lors du projet), puis alignées à la séquence consensus disponible dans la base de données NCBI (NC_000007.14, gene ID 1080) pour repérer d'éventuelles variations (INDELs et/ou SNPs). Les résultats du séquençage et de l'alignement de ces dix échantillons sont présentés dans la figure 24.



<u>Figure 24</u> : Alignements de séquences encadrant l'exon 2 du gène *CFTR* avec la séquence consensus disponible dans la base de données NCBI. Séquence de l'exon 2 indiquée en rouge ; SNPs surlignés en jaune (S = G ou C, D = A, T ou G).

1.2.2.2.Validation des paires de TALE nucléases ciblant l'exon 2 du gène CFTR

Au commencement de ce projet de thèse, la technologie des endonucléases artificielles CRISPR-Cas9 n'avait pas encore fait l'objet de publications scientifiques. Nous avions alors initié une collaboration avec la plateforme TALGENE. En tenant compte des résultats du génotypage, la plateforme nous a fourni deux paires de TALE nucléases ciblant l'exon 2 du gène *CFTR* que nous avons validées par transfection dans des cellules HEK293T. L'expression des nucléases a été confirmée par détection du tag HA par Western blot. La fréquence de modification mesurée grâce à l'enzyme T7E1 variait de 30% à 35% pour la paire 1 et de 24% à 40% pour la paire 2 (Figure 25).



<u>Figure 25</u> : Fréquence de modification des paires de TALE nucléases ciblant l'exon 2 du gène *CFTR. Des cellules HEK293T ont été transfectées avec les plasmides correspondant aux paires de TALE nucléases 1 et 2 puis les protéines et l'ADNg ont été extraits trois jours post-transfection. (A) L'expression du tag HA fusionné à chacune des nucléases a été validée par western blot. (B) La fréquence de modification des nucléases a été calculée en utilisant l'enzyme T7E1. Le pourcentage est indiqué sous la photographie du gel.*

Cependant, la présence de nombreuses séquences répétées complique fortement la vectorisation des paires de TALE nucléases dans des vecteurs lentiviraux comme ceux dérivés du VIH-1. Une stratégie utilisant des vecteurs issus du virus Sendaï a dans un premier temps été envisagée, avant que la technologie des CRISPR-Cas9 émerge. Aux vues de la possibilité de vectorisation dans les vecteurs lentiviraux et à la relative facilité de construction de séquences cibles, cette stratégie a été préférée pour la suite du projet.

1.2.2.3.Sélection et validation de séquences sgRNA ciblant l'exon 2 du gène CFTR

Jinek *et al.* ont décrit un système simple mimant la double structure ARN du système CRISPR-Cas9 des bactéries permettant de cibler un locus spécifique et d'y introduire une cassure double-brin²⁸². Ce système conserve une séquence de reconnaissance spécifique de 20 nucléotides à laquelle est fusionné un motif de reconnaissance du PAM de la forme « NGG ». Seules deux séquences du type « GN₁₉NGG » ont été trouvées dans l'exon 2 du *CFTR* (Tableau 6). La recherche de cibles du type « N₁₃NGG » a permis une première vérification de la spécificité de ces séquences.

Sequence	Position dans l'exon 2	Brin	Séquence
TS-JB1	22-44 (23pb)	+	GAAAGGATACAGACAGCGCCTGG
TS-JB2	40-63 (23pb)	-	GGTATATGTCTGACAATTCCAGG

Tableau 6 : Résultats de la recherche de séquences sgRNA ciblant l'exon 2 du gène CFTR.

Ces deux séquences cibles ont ensuite été clonées dans un plasmide lentiviral sous contrôle du promoteur U6 en parallèle de la cassette d'expression de l'endonucléase Cas9 fusionnée au gène rapporteur de la GFP (Supplementary figure 1, page 144-145). Cette protéine de fusion permet de quantifier le taux d'expression et d'isoler les cellules modifiées par FACS. L'activité de coupure des séquences TSJB1 et TSJB2 a été vérifiée par transfection de cellules HEK293T avec les plasmides exprimant l'une des séquences sgRNA ciblant l'exon 2 du *CFTR* et/ou l'endonucléase Cas9 fusionnée à la GFP (Figure 26).



<u>Figure 26</u> : Fréquence de modification des séquences sgRNA TSJB1 et TSJB2 ciblant l'exon 2 du gène *CFTR*. *Des cellules HEK293T ont été transfectées avec les plasmides indiqués au dessus de la photographie du gel puis l'ADNg a été extrait trois jours post-transfection*. La *fréquence de modification des nucléases a été calculée en utilisant l'enzyme T7E1*. *T107 : plasmide CMV-Cas9-HA-GFP, pJB21 : plasmide SFFV-Cas9-HA-GFP (plasmide lentiviral), pJB22 : plasmide U6-TSJB1gRNA, pJB23 : plasmide U6-TSJB2gRNA, pJB24 : plasmide U6-TSJB1gRNA-SFFV-Cas9-GFP (plasmide lentiviral), pJB25 : plasmide U6-TSJB2gRNA-SFFV-Cas9-GFP (plasmide lentiviral).*

Ces résultats ont ainsi confirmé l'activité de modification des deux plasmides lentiviraux « tout-en-un » exprimant l'ensemble des composants du système CRISPR-Cas9 et ciblant l'exon 2 du gène *CFTR* pour la poursuite de cette stratégie dans les cellules Calu-3 et les cellules épithéliales repsiratoires humaines primaires.

2. <u>CFTR</u> Invalidation by Lentiviral Vector-mediated RNA Interference and <u>CRISPR-Cas9 Genome Editing in Human Airway Epithelial Cells</u>

Les cultures de cellules épithéliales respiratoires polarisées modélisant le défaut du gène *CFTR* jouent un rôle essentiel dans la recherche sur la mucoviscidose. La mise au point de modèles d'invalidation a largement bénéficié des techniques de l'interférence ARN et de son potentiel inhibiteur pour des pathologies diverses. Plus récemment, les endonucléases artificielles de type CRISPR-Cas9 se sont révélées un outil particulièrement utile pour l'invalidation de gène.

Des cellules Calu-3 et des cellules épithéliales respiratoires humaines primaires ont été transduites avec des vecteurs lentiviraux dérivés du HIV-1 exprimant le gène rapporteur de la GFP et des séquences shRNA ou les composants du système CRISPR-Cas9 ciblant le gène *CFTR*. L'expression du *CFTR* dans les cellules polarisées ou différenciées exprimant la GFP a été mesurée par RT-qPCR et par Western blot et la fonction du canal a été évaluée en chambre d'Ussing. La sécrétion de chimiokines et les propriétés de prolifération et de migration des cellules modifiées ont également été étudiées.

Les stratégies de l'interférence ARN et d'édition de gène par le système CRISPR-Cas9 ont induit une inhibition de l'expression du *CFTR* dans les cellules Calu-3. Seules les cellules exprimant les endonucléases artificielles ont montré une invalidation importante au niveau fonctionnel. Si l'expression de séquences shRNA spécifiques n'a pas permis de réduire l'expression du gène *CFTR* dans les cellules primaires, l'activité nucléasique du système CRISPR-Cas9 a pu être associée à une réduction des transports ioniques transépithéliaux et de la réponse du canal CFTR à son inhibiteur spécifique Gly-H101. Les propriétés de migration et de prolifération n'ont pas été affectées par l'invalidation du gène *CFTR* dans les cellules Calu-3 modifiées avec le système CRISPR-Cas9 mais une augmentation de la sécrétion basale d'IL-8 a été constatée.

Nous avons généré de nouvelles lignées cellulaires immortalisées invalidées pour le gène *CFTR* et démontré que des épithéliums primaires CF et leurs contrôles isogéniques peuvent être générés en utilisant un protocole de vectorisation du système CRISPR-Cas9 dans un vecteur lentiviral unique. Ceci constitue la première étape de la manipulation de l'expression du gène *CFTR* dans ce type de cultures.

CFTR Invalidation by Lentiviral Vector-mediated RNA Interference and CRISPR-Cas9 Genome Editing in Human Airway Epithelial Cells

Jessica Bellec^{1, 2}, Marc Bacchetta³, Davide Losa³, Ignacio Anegon^{1, 2}, Marc Chanson³*, Tuan Huy Nguyen^{1, 2}*

¹INSERM UMR 1064, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, Nantes,

France

²CHU Hôtel Dieu, Institut de Transplantation en Urologie et Néphrologie, Nantes, France ³Geneva University Hospitals and University of Geneva, Geneva, Switzerland

* Authors contributed equally to this work

Running title: Targeting CFTR in polarized airway epithelium

Corresponding author: Marc Chanson, PhD Laboratory of Clinical Investigation III Department of Paediatrics and Department of Cell Physiology & Metabolism 1 rue Michel-Servet 1211 Geneva, Switzerland

Phone: +41 22 37 95 206 Fax: +41 22 37 95 260 marc.chanson@hcuge.ch, marc.chanson@unige.ch

Abstract

Background: Polarized airway epithelial cell cultures modelling *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (CFTR) defect are crucial for CF research and biomedical research. RNA interference has proven its value to generate knockdown models for various pathologies. More recently, genome editing using CRISPR-Cas9 artificial endonuclease was a worthy addition to the toolbox of gene invalidation.

Methods: Calu-3 cells and primary HAECs were transduced with HIV-1-derived lentiviral vectors (LVV) encoding small hairpin RNA (shRNA) sequence or CRISPR-Cas9 components targeting *CFTR* alongside GFP. After sorting of GFP-positive cells, *CFTR* expression was measured by RT-qPCR and Western blot in polarized or differentiated cells. CFTR channel function was assessed in Ussing chambers. Modified cells were also characterized regarding chemokine secretion, proliferation and migration.

Results: shRNA interference and CRISPR-Cas9 strategies efficiently decreased *CFTR* expression in Calu-3 cells. Strong *CFTR* knockdown was confirmed at the functional level in CRISPR-Cas9-modified cells. *CFTR*-specific shRNA sequences did not reduce gene expression in primary HAECs, whereas CRISPR-Cas9-mediated gene modification activity was correlated with a reduction of transepithelial secretion and response to the CFTR-inhibitor Gly-H101. *CFTR* invalidation in the CRISPR-Cas9-modified Calu-3 cells did not affect migration and proliferation but increased basal interleukin-8 secretion.

Conclusion: We generated immortalized CFTR-invalidated cell lines and demonstrated that CRISPR-Cas9 vectorised in a single LVV efficiently promotes *CFTR* invalidation in primary HAECs. These results provide a new protocol to engineer CF primary epithelia with their isogenic controls and pave the way for manipulation of *CFTR* expression in these cultures.

Keywords: *CFTR*, CRISPR-Cas9, Cystic Fibrosis, lentiviral vector, primary cells, RNA interference

Introduction

Understanding of a pathology and its underlying mechanisms benefits from the modulation of gene expression at the cellular or whole organism level. Advances in molecular techniques have allowed manipulating gene expression in many cell systems. RNA interference (RNAi) enables fine tuning of gene expression via endogenous long double-stranded DNAs or synthetic micro or small interfering RNAs (miRNA and siRNA). RNAi is fast, easy and highly efficient but gene repression is transient and restricted to cells amenable to transfection. An alternative approach has been found by means of small hairpin RNAs (shRNA) that can be stably integrated into host cell genome using viral vectors [1]. Lentiviral vectors (LVV) are particularly well adapted due to their ability to deliver large transgenes into dividing or quiescent cells [2], including primary airway epithelial cells (HAECs) [3–5], and have already been broadly used to induce shRNA-mediated gene knock-down [6]. In parallel, technologies have been developed to directly modify genomic DNA sequences. Artificial endonucleases have been the object of considerable attention due to their ability to create double-strand breaks (DSB) at a specific locus in genomic DNA (gDNA). The type II clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-CRISPR associated (Cas) system from the adaptive immune system of bacteria and archaea provides a novel effective tool for genome editing [7]. Cleavage by the endonuclease Cas9 from S. pyogenes is initiated by the recognition of a specific 20-nucleotide DNA sequence and a protospacer adjacent motif (PAM) by a crRNA combined with an activating tracrRNA. A single guide RNA (sgRNA) mimicking this two-RNA structure has been engineered to drive Cas 9-induced DSB [8] facilitating design and vectorization in LVVs [9].

RNAi and genome editing strategies have been successfully used to generate cell and transgenic animal models and for therapeutics purposes [10,11] in various pathologies including cystic fibrosis (CF) [12]. CF is caused by mutations in the *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (*CFTR*) gene, which codes for a chloride channel expressed in epithelial barriers[13]. These mutations induce defects in various organ systems but the most common lethal consequence nowadays is the development of a chronic lung disease. In the airways, CF is characterized by chronic infection, deleterious inflammation and tissue remodelling. However, how mutations in *CFTR* lead to the development of chronic infection and inflammation remains a matter of debate. Animal models developed in mice,

pigs and ferrets [14–18] are valuable for CF research, but they are expensive to handle and species differences are clearly apparent in the severity of various aspects of CF. Although numerous CF and non-CF cell lines [19] are available to investigate the molecular and cellular defects caused by CFTR mutations, bias can originate from culture types and experimental conditions therefore limiting their interpretation and generating contradictory conclusions.

In this study, we compared RNAi and CRISPR-Cas9 genome editing strategies to target *CFTR* gene and evaluated the best approach to induce long-term invalidation in a cellular model capable of polarisation and differentiation. shRNAi and CRISPR-Cas9 strategies were first developed in the Calu-3 cell line, which strongly expresses *CFTR* and form polarized monolayers with intercellular junctions and transepithelial resistances[20]. However, Calu-3 cells cannot resume the morphology of fully-differentiated epithelia. Primary HAECs more closely resemble the native airway epithelium and are capable of differentiation in a pseudo-stratified mucociliated epithelium [21]. Primary cultures can be initiated from CF and non-CF patient airway biopsies. Nonetheless, these cultures remain limited because of scarce availability of biopsies from CF patients, their high variability in terms of genotype, history of infections and treatments, and, importantly, because isogenic controls are not available. Recently, Ramachandran *et al.* [22] proposed a protocol to knockdown *CFTR* using siRNA but this requires a maximum seeding density that is not compatible with cell proliferation. There is currently no stable CFTR-knockdown or knockout model in primary HAECs.

We have generated two Calu-3 cell lines in which CFTR protein expression is stably impaired either by shRNAi or CRISPR-Cas9 genome editing. Only CRISPR-Cas9-modified cells reproduced the characteristic CFTR-mediated current defect and showed increased release of the pro-inflammatory mediator interleukin (IL)-8. Optimized molecular tools and protocols were also applied to primary HAECs. Transduction with HIV-1 LVV expressing CRISPR-Cas9 system efficiently invalidated *CFTR* gene. Our work has led to the generation of immortalized CFTR-invalidated cell lines and new vectors demonstrating the great potential of CRISPR-Cas9 system for CF disease modelling in differentiated primary HAECs.

Materials and Methods

Cell culture

Human airway epithelial Calu-3 cells (HTB-55TM) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and maintained in Minimum Essential Media (MEM) supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (FBS), 1% non-essential amino acids, 1% sodium pyruvate and 1% penicillin/streptomycin. All reagents except FBS were purchased from Life Technologies (Saint-Aubin, France). Well-polarized monolayers of Calu-3 cells were obtained by seeding 1-1.5×10⁵ cells onto 0.33cm² porous (0.4µm) Transwell polyester inserts (Transwell 3470, Corning Life Sciences, Hazebrouck, France) and culture for 14-20 days under submerged conditions.

Primary HAECs were purchased from Epithelix (Plan-Les-Ouates, Switzerland) and maintained according to manufacturer's instructions. To obtain well-differentiated primary epithelium, primary HAECs were seeded at 2.5×10^5 cells onto 0.33cm² porous (0.4µm) Transwell polyester inserts and left to proliferate into CNT17 medium (CellnTec, Bern, Switzerland). Differentiation was induced by culture at the air-liquid interface (ALI) for at least 30 days [23].

DNA constructs

siRNA sequences targeting CFTR mRNA (sequence 1: 5'-TTGGATGACCTTCTGCCTCTTAC-3' and sequence 2: 5'-AACAACAGGAGAAGGAAGGAAGGAA-3') and a non-specific siRNA (Alter: 5'-GATAGAAAGGATTGACAGTGGTG-3') were embedded in the following structure, 5'-CGCGTCCCC-sense siRNA-TCAAGAG-anti-sense siRNA-TTTTTGGAAAT-3', to form shRNA sequences. shRNA oligos were then cloned into pLVTHM (Addgene 12247, kind gift from D. Trono, EPFL, Switzerland) LVV backbone in *Mlul-Clal* restriction sites to obtain sh1, sh2 and shAlter DNA constructs.

Cas9-HA-GFP sequence from plasmid pMJ920 (Addgene 42234) was cloned downstream the spleen focus-forming virus (SFFV) promoter in the HIV-1-derived lentiviral vector backbone RRLSIN-cPPT-SFFV-GFP-WPRE (kindly provided by Els Verhoyen, INSERM U1111, France) to produce the control plasmid (CTL). Two N19NGG sequences targeting

CFTR exon 2 (TSJB1: 5'-CACCGAAAGGATACAGACAGCGCC-3' and TSJB2: 5'-CACCGGTATATGTCTGACAATTCC-3') were cloned into plasmid pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene 42230) in *Bbsl* cloning sites. Each pU6-single-guideRNA (sgRNA) expression cassette containing a targeting sequence corresponding to nucleotides 117 504 274 to 117 504 296 (TSJB1) and 117 504 292 to 117 504 314 (TSJB2) in *CFTR* exon 2 was PCR-amplified and introduced into CTL plasmid to produce TSJB1 and TSJB2 plasmids.

HIV-1-derived lentiviral vector production and cell transduction

HIV-1-derived LVVs were produced using the triple transfection method with calcium phosphate [24]. Briefly, HEK293T cells were transfected with the LVV plasmid of interest, the packaging plasmid psPAX2 (Addgene 12260) and the vesicular stomatitis virus G (VSV-G) envelop protein coding plasmid pMD2.G (Addgene 12259). Media was replaced 18 hours post-transfection. Media was supplemented with 10mM sodium butyrate for the production of CRISPR LVVs. Supernatant containing lentiviral vector particles was harvested 24 hours later. Viral stocks were concentrated at 10 000 rpm and 4°C for 18-20 hours, resuspended in advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies) and stored at - 80°C. LVV titre was determined by flow cytometry following transduction of HeLa cells with a dose range of concentrated vector. Titre was calculated as follows: ((% of GFP positive cells/100) × number of cells at transduction × dilution factor)/volume added, and expressed as HeLa transducing units (TU)/mL. Titres ranged from 10^7 - 10^9 HeLa TU/mL depending on the transgene of interest.

Flow cytometry Analysis and Cell Sorting (FACS)

Flow cytometric analysis of cells transduced with HIV-1-derived LVVs was performed using a FACS Cantoll and the BDFacsDiva software (BD Biosciences, Le pont de Claix, France). Percentages of GFP positive cells were determined using FlowJo software.

Sorting of GFP positive cells was performed using a FACS Aria (BD Biosciences) or by the flow cytometry core facility (Hopitaux Universitaires de Genève, Geneva, Switzerland).

T7E1 mismatch detection assay

Genomic DNA (gDNA) was extracted using a phenol-chloroform protocol and quantified using the NanoDrop2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). A260/A280 and A260/A230 ratios accounted for sample purity.

Gene modification activity of sgRNA sequences at the target locus of *CFTR* exon 2 and at the four most probable off-target sites (http://crispr.mit.edu [25]) was quantified using the T7E1 mismatch detection assay. DNA sequence of interest was PCR-amplified using Taq Platinum HiFi polymerase (Invitrogen[™], Life Technologies), forward primer 5'-TGTAGCCTGTAAGAGATGAAGC-3' and reverse primer 5'-CAATCCTCTCATCTTGGCCTC-3'. The 451bp PCR product was then denatured and slowly re-annealed (95°C, 2min ; 95°C to 85°C, -2°C/sec ; 85°C to 25°C, -1°C/sec) to produce homoduplex/heteroduplex mix. This was then digested by the T7E1 restriction enzyme (3 units) at 37°C for 30 minutes. Digestion products were separated by capillary gel electrophoresis using Caliper (Perkin Elmer, Waltham, MA) and their relative amounts was calculated using the LabChip GX Touch data analysis software (Perkin Elmer).

Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted using the NucleoSpin[®] RNA II kit (Macherey Nagel, Hoerdt, France) and quantified using the NanoDrop2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). A260/A280 and A260/A230 ratios accounted for sample purity. Reverse transcription was performed using the Quantitect reverse-transcriptase kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and 200ng RNA following manufacturer's protocol. PCR were performed by the genomic core facility (Hopitaux Universitaires de Genève, Geneva, Switzerland) using TaqMan gene expression assays and TaqMan Fast master mix (Applied Biosystems, Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Reactions were performed in triplicate and the relative abundance of CFTR mRNA was calculated using the $\Delta\Delta$ cycle threshold method relative to GAPDH mRNA abundance.

Western blotting

Proteins were incubated in a solubilisation buffer (65mM Tris, 150mM NaCl, Nonidet-P40 1%, protease inhibitor mix 1X (Roche)) for 30 minutes at 4°C. Samples were then centrifuged at 10 000×g and 4°C for 15 minutes and supernatant was harvested and stored at -20°C until use. Proteins were quantified by a bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce, Thermo Fisher Scientific). Equal amounts of total proteins were separated on a sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred on a polyvinylidene fluoride (PVDF) or a nitrocellulose membrane using the semi-dry transfer technic. Membrane was blocked in TBS-T buffer (20mM Tris, 140mM NaCl, Tween-20 0.1%) containing 5% defatted milk for a minimum of 1 hour at room temperature (RT) under agitation. Membrane was first incubated with mouse monoclonal anti-human CFTR antibody (C-Terminus clone 24.1, MAB25031, R&D Systems, Lille, France) or mouse monoclonal Anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) antibody (clone 6C5, MAB374, Millipore, Guyancourt, France) diluted 1-in-1 000 and 1-in-2 000 in TBS-T buffer containing 1% defatted milk respectively. Membrane was then blotted with polyclonal goat anti-mouse Horse Raddish Peroxidase (HRP)-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) and revealed using SuperSignal West Pico kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific). Band intensities were quantified using ImageJ software. CFTR protein expression was normalized to GAPDH house-keeping gene expression.

Electrophysiological studies

CFTR channel activity was assessed by measurement of transepithelial short-circuit currents (Isc) in Ussing chamber device (Physiologic Instruments, San Diego, CA). Basal chamber was filled with a Krebs buffer containing 134mM NaCl, 4.8mM KCl, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄-7H₂O, 5mM NaHCO₃, 2.5mM CaCl₂, 10mM Hepes and 1mM glucose (pH 7.4). Apical chamber was filled with a Krebs buffer containing 119mM Na gluconate, 15mM NaCl, 4.8mM K gluconate, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄-7H₂O, 5mM NaHCO₃, 2.5mM CaCl₂, 10mM Hepes and 1mM glucose (pH 7.4). Apical chamber was filled with a Krebs buffer containing 119mM Na gluconate, 15mM NaCl, 4.8mM K gluconate, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄-7H₂O, 5mM NaHCO₃, 2.5mM CaCl₂, 10mM Hepes and 1mM glucose (pH 7.4). The transepithelial potential difference was voltage-clamped at zero and the resulting Isc was recorded using a VCC MC6 amplifier (Physiological Instruments). Data were acquired using the interface DI-720 (DataQ Instruments) and

Acquire & Analyze software 2.3 (Physiological Instruments). Epithelial sodium channels (ENaC)-mediated currents were blocked by the addition of amiloride (100 μ M final concentration) in the apical chamber. CFTR-mediated currents were stimulated by the addition isoproterenol (100 μ M final concentration) in the basal chamber and finally inhibited by the addition of the specific blocker Gly-H101 (20 μ M final concentration) in the apical chamber.

Migration and proliferation assay

To assess migration and proliferation properties of shRNA- or CRISPR-modified Calu-3 cells, untransduced, shAlter, sh1+sh2, CTL and TSJB1 cells (5×10^4) were seeded in silicone cultureinserts (IB-80209, ibidi, Biovalley, Marne-la-Vallée, France) and cultured until confluence at which point the chambers were removed (t=0h). Gap closure was monitored 15 hours later (t=15h). Pictures were taken at t=0h and t=15h using the EVOS FL microscope (AMG, Bothell, WA) and the entire gap surface was reconstructed using Photoshop software. The gap area was measured as a pixel number using ImageJ software.

To quantify the number of proliferating cells, inserts were fixed in 4% paraformaldehyde for 15min and then processed in the following solutions: PBS-Triton 0.1% for 10min, NH₄Cl 0.5M for 15min and PBS-BSA 2% for 15min. Calu-3 cells were then incubated with the monoclonal anti-Ki-67 antibody (1-in-1 00 dilution, mib1, DAKO, Les Ulis, France) followed by a goat anti-mouse Alexa 568 antibody (1-in-1 500, Jackson ImmunoResearch Laboratories). DAPI was used to stain nuclei. Ki-67 and DAPI-positive cells were counted using ImageJ software.

IL-8 secretion

Pro-inflammatory cytokine IL-8 secretion was measured 11 days post-seeding. Apical and basolateral supernatants (n=6) were collected 24h after the last media change and IL-8 protein abundance was determined using Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go! (2nd generation) kit (Ref 88-8086-22, Affymetrix eBioscience, Paris, France) following manufacturer's protocol. Samples were diluted 1-in-100 and assayed in triplicate. Total proteins were extracted and quantified as described above and were similar in the different samples

(2.4mg ±0.08 in untransduced cells, 2.3mg±0.04 in cells transduced with CTL LVV and 2.3mg±0.05 in cells transduced with TSJB1 LVV). IL-8 secretion was normalized to the total amount of proteins.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Statistical significance was calculated using GraphPad Prism software with a p value <0.05 considered as significant. Cell populations were compared using the non-parametric Kruskal-Wallis test with the Dunn's multiple comparisons test correction or a Mann-Whitney test. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001

Results

Transduction with HIV-derived lentiviral vector allowed stable expression of shRNA constructs and active CRISPR-Cas9 system in Calu-3 and primary human airway epithelial cells

To stably silence CFTR gene in Calu-3 cells and primary HAECs, we cloned three shRNA sequences against CFTR mRNA selected among six sequences and a non-specific shRNA sequence (shCFTR and shAlter respectively) in a HIV-1-derived LVV backbone also expressing the GFP reporter gene (Supplementary figure 1A). In parallel, we also designed and cloned two single sgRNA targeting CFTR exon 2 (TSJB1 and TSJB2), alongside the Cas9-HA-GFP expression cassette in a HIV-1-derived LVV backbone. The construct lacking a sgRNA sequence was used to generate a control cell line (CTL Calu-3 cells, Supplementary figure 1A). shRNA and CRISPR-Cas9 LVVs efficiently transduced both Calu-3 cells and primary HAECs as shown by FACS analysis of GFP expression (46% ±4% in Calu-3 cells with an MOI of 2, 65% ±2% in Calu-3 cells with an MOI of 10, and 68% ±4% in HAECS, Supplementary figure 1B). The optimal multiplicity of infection (MOI) was determined using dose ranges of LVVs in Calu-3 cells. MOI 10 was the optimal dose regarding transduction efficiency and cytotoxicity using shRNA LVVs (data not shown). The three shCFTR sequences were assessed for their ability to inhibit CFTR gene expression. shCFTR and shAlter Calu-3 cell lines were generated by transduction or co-transduction with LVVs followed by FACS sorting of GFP positive cells. CFTR silencing was assessed by RT-qPCR and western blot. The combination of shCFTR sequence 1 and shCFTR sequence 2 (sh1+sh2 Calu-3 cells) induced the highest knock-down activity (data not shown). Calu-3 cells were also transduced with a dose range of CRISPR-Cas9 LVVs. A week post-transduction (PT), GFP fluorescence and CRISPR-Cas9 activity were measured by FACS and using the T7E1 mismatch detection assay. MOI 2 was the optimal dose as shown in Figure 1A. Indeed, despite the transduction efficiency was slightly lower at MOI 2, the cleaving activity did not increase with the LVV dose at transduction. Target sequence TSJB1 gave both higher levels of transduction and CRISPR-Cas9 activity (Figure 1A) which was sustained overtime in the resultant cell line (TSJB1 Calu-3 cells, Figure 1B). Offtarget effects are the major concern when using artificial endonucleases for genome editing. However, non-specific cleaving activity was not detected in CTL or TSJB1 Calu-3 cell lines in the four most probable off-target sites (Figure 1C).

In view of these observations, primary HAECs were transduced with shRNA LVV (shAlter, sh1 and sh2) at MOI 10. Two doses were tested for CRISPR LVVs (CTL and TSJB1). GFP positive cells were FACS sorted a week PT to measure CRISPR-Cas9 activity by the T7E1 mismatch detection assay. Modification activity was about two-fold higher with a MOI of 10 compared to a MOI of 2 (41% and 48% compared to 18% and 29% respectively, Figure 1D). Thus, this dose was used for consequent experiments in primary HAECs.

shRNA interference and CRISPR-Cas9 genome editing induced stable CFTR inhibition in Calu-3 cells

To quantify and compare the consequences of shRNA interference and CRISPR-Cas9 genome editing in our Calu-3 cells lines, untransduced (UTC), shAlter, sh1+sh2, CTL and TSJB1 Calu-3 cells were cultured on semi-permeable supports under submerged conditions for 14-20 days and *CFTR* invalidation was assessed by RT-qPCR and western blot. CFTR mRNA in sh1+sh2 Calu-3 cells (0.3 fold change ± 0.04 , n=6) was reduced by 63% (p=0.0006) compared to shAlter Calu-3 cells (0.8 fold change ± 0.07 , n=7, Figure 2A). Western blot confirmed this invalidation with a decrease of 77% (p=0.002) of the protein content in sh1+sh2 Calu-3 cells (0.3 fold change ± 0.09 , n=6) as compared to shAlter Calu-3 cells (1.4 fold change ± 0.2 n=5, Figure 2C). No statistical difference was observed in CFTR mRNA and protein contents between UTC and shAlter Calu-3 cell lines.

No difference in CFTR mRNA content was observed between CTL and TSJB1 Calu-3 cells (1.2 fold change ±0.07 in TSJB1 cells compared to 1.3 fold change ±0.1 in CTL cells, Figure 2B) indicating that CRISPR-Cas9 activity confirmed in TSJB1 Calu-3 cells (Figure 1B) did not induced mutations that altered expression of CFTR mRNA sequences that can be detected by RT-qPCR. However, decrease of CFTR protein expression was confirmed by Western blot (-70%, p<0.0001) in TSJB1 Calu-3 cells (0.3 fold change ±0.05, n=8) compared CTL Calu-3 cells (n=8, Figure 2D). No difference was observed in CFTR protein content between UTC and CTL Calu-3 cell lines.

In summary, these results indicate that shRNA expression and CRISPR-Cas9 activity efficiently induced strong and stable *CFTR* invalidation in Calu-3 cells.

CRISPR-Cas9 system strongly impaired CFTR function at the electrophysiological level in Calu-3 cells and primary HAECs

CF phenotype is characterized by the alteration of transepithelial currents particularly by a poor or absent chloride fluxes through CFTR channels [26]. We therefore determine whether CFTR invalidation at the post-transcriptional level correlates with the defect of CFTRmediated currents in modified Calu-3 cells. UTC, shAlter, sh1+sh2, CTL and TSJB1 Calu-3 cells. were cultured on semi-permeable supports under submerged conditions for 14-20 days and short-circuit currents (Isc) were studied in Ussing chamber device. After stabilization of the polarized monolayers (Isc_{basal}), CFTR channels were stimulated with isoproterenol, a $\beta 2$ adrenergic receptor agonist which activates protein kinase A (PKA) via the rise of intracellular cAMP concentration (Isc_{act. CFTR}). CFTR-mediated currents were finally inhibited by the specific blocker Gly-H101 (Isc_{inh. CFTR}). Representative recordings of transepithelial currents in CRISPR-Cas9 Calu-3 cells are shown in Figure 3A. Typically, we observed two types of behaviour in UTC Calu-3 cells. In some series of experiments, UTC cells showed high basal Isc that could weakly be increased further by isoproterenol (data not shown). In other series, isoproterenol induced large outward currents from a lower basal Isc (Figure 3A). This heterogeneity in basal Isc and isoproterenol-induced currents was also observed in control shAlter and CTL Calu-3 cells (Figure 3B and 3C). In all cases, Isc were reduced by Gly-H101, indicating that currents were carried by CFTR activity. Basal Isc were significantly lower in TSJB1 Calu-3 cells (-4.2μa.cm² ±0.9, n=9) compared to CTL Calu-3 cells (0.3μa.cm² ±1.2, n=9, Figure 3C) but not in sh1+sh2 Calu-3 cells (-1.2µa.cm² ±1.1, n=4) compared to shAlter Calu-3 cells (-2.9µa.cm² ±4.5, n=4, Figure 3B). Figure 3D and 3E showed the fold changes of CFTRmediated currents following inhibition relative to UTC cells. Only Calu-3 cells modified with CRISPR-Cas9 system showed a strong 85% CFTR knock-down at the electrophysiological level (0.2 fold change ±0.02 in TSJB1 cells, n=9, compared to 1.5 fold change ±0.2 in CTL cells, n=8, p<0.0001). These results demonstrate that CFTR invalidation by shRNA interference does not support a loss of function characteristic of CF phenotype compared to CRISPR-Cas9 modified Calu-3 cells. These cell lines therefore may represent a good model for CF.

shRNA interference and CRISPR-Cas9 genome editing strategies were evaluated in primary HAECs as described in Supplementary figure 2. Cells were cultured at the ALI for 30-40 days for differentiation and assayed in Ussing chamber device. Epithelia were stimulated

Résultats et conclusions

as described for Calu-3 cells except that ENaC channels were inhibited by the addition of amiloride before CFTR activation by isoproterenol. Transepithelial resistances were measured in all epithelia and confirmed primary HAECs polarization (Figure 4A and 4B). Transduction with sh1 and sh2 LVVs did not induce *CFTR* knock-down at the electrophysiological level compared to shAlter cells (n=4, Figure 4C). In contrast, expression of CRISPR-Cas9 system induced an 80% decrease (p=0.0012) of transepithelial current variations following CFTR channel inhibition by Gly-H101 in TSJB1 epithelia (0.2 fold change ±0.05, n=7, Figure 4D) compared to CTL ones. These results confirm that our CRISPR-Cas9 LVV construct can efficiently target *CFTR* expression in primary HAECs.

Combination of shRNA and CRISPR-Cas9 strategies did not further improve CFTR invalidation

shRNA induced *CFTR* knock-down at the protein level but the effect on transepithelial currents was not strong enough to mirror electrophysiological CF defect. Genome editing by CRISPR-Cas9 system significantly reduced but did not abrogate CFTR-mediated currents. We therefore investigated whether the combination of both strategies would lead to complete *CFTR* invalidation. CTL and TSJB1 Calu-3 cells were transduced with shAlter and sh1+sh2 LVVs at MOI 10 respectively. CRISPR-Cas9 cleaving activity did not affect CFTR mRNA (Figure 2B). Following transduction of TSJB1 Calu-3 cells with sh1 and sh2 LVVs, mRNA levels were reduced by 50% (p=0.0143) as shown in Figure 5A (0.6 fold change ±0.03 in TSJB1/sh1+sh2 cells, n=4, compared to 1.2 fold change ±0.05 in CTL/shAlter cells, n=4). However, shRNA interference did not further reduce CFTR protein expression (0.4 fold change ±0.08 in TSJB1/sh1+sh2 cells, n=4, compared to 1.2 fold change ±0.7 in CTL/shAlter cells, n=4, -67%, Figure 5B) and CFTR-mediated transepithelial currents (0.6 fold change ±0.12 in TSJB1/sh1+sh2, n=5, compared to 3.2 fold change ±0.6 in CTL/shAlter cells, n=5, -81%, Figure 5D and 5E) in the TSJB1 Calu-3 cells. The double-knockdown strategy therefore is not the best approach to induce long-term *CFTR* invalidation.

CRISPR-Cas9 CFTR invalidation enhanced interleukin-8 release by Calu-3 cells

To examine the effect of CFTR invalidation on Calu-3 cell phenotype, we monitored cell migration and proliferation as well as release of the pro-inflammatory chemokine IL-8. Gap healing experiments were performed on CTL and TSJB1 Calu-3 cells. As shown in Figure 6A, no difference in the gap healing rate measured after 15 hours was observed between CTL (0.7 initial surface repaired ± 0.04 , n=10) and TSJB1 Calu-3 cells (0.7 surface repaired ± 0.03 , n=11). Cell proliferation was also determined at 15 hours by immunodetection of the nuclear marker Ki-67. Ki-67 proliferation index was similar in both cell lines (47% Ki-67 positive cells ±0.02 in CTL cells compared to 46% Ki-67 positive cells ±0.02 in TSJB1 cells, n=25, Figure 6B). Together these results indicate that CFTR invalidation does not affect cell proliferation and migration in CFTR knocked-down Calu-3 cells. We next measured by ELISA the unstimulated apical and basolateral release of IL-8 by CTL and TSJB1 Calu-3 cells polarized on Transwell inserts (Figure 6C). As shown in Figure 6D, apical and basolateral IL-8 secretion were respectively increased by 28% (p=0.0087) and 13% in in TSJB1 Calu-3 cells (1.5 fold change±0.03 and 1.6 fold change±0.1, n=6) compared to CTL Calu-3 cells (1.2 fold change ±0.06 and 1.4 fold change±0.08, n=6). IL-8 secretion was not significantly different between UTC and CTL Calu-3 cells. In summary, these results indicate that CFTR silencing in Calu-3 cells enhanced IL-8 secretion but did not affect their migratory and proliferating properties.

Discussion

In the present study, we compared the efficiency of lentiviral-mediated shRNA and CRISPR-Cas9 strategies to invalidate the expression of *CFTR* gene in polarized HAECs. We report high transduction efficiency with both LVVs in the Calu-3 cell line and in primary HAECs. Expression of shRNA sequences and CRISPR-Cas9 system was associated with decreased expression of *CFTR*. However, only the CRISPR-Cas9 strategy reduced CFTR activity in terms of ion transport in polarized epithelia. In addition, CFTR knocked-down Calu-3 cells with the CRISPR-Cas9 strategy retained normal migration and proliferation profiles but showed enhanced release of the pro-inflammatory chemokine IL-8. To our knowledge, this is the first report using the CRISPR-Cas9 molecular tool to generate CF-like airway epithelial cell models.

HIV1-derived LVVs were used to mediate shRNA interference and genome editing using CRISPR-Cas9 system to stably knockdown CFTR. Indeed, viral gene transfer is more efficient than non-viral delivery methods, particularly in primary cells. LVV was chosen in preference to adenovirus or adeno-associated virus (AAV), for its ability to transduced both quiescent and non-quiescent cells, to integrate a transgene within the host genome, and its large encapsidation capacity [27]. HIV-derived LVVs were pseudotyped with VSV-G envelop for its broad tropism and its stability allowing production of high titre vector stocks. Consistently high transduction efficiencies were obtained in both Calu-3 cells and primary HAECs as measured by GFP expression. This was dose- and vector-dependent and in agreement with previous studies using HIV-derived LVVs in AECs [3,4,28]. Particularly Borok et al. obtained 30% and 80% of GFP-positive cells following transduction of rat AECs with MOIs of 1.6 and 12.8 respectively. Although similar levels of transfection can be obtained with small interfering oligonucleotides [22,29], this does not allow stable integration and expression. Expression of the GFP reporter gene encoded in our shRNA and CRISPR-Cas9 plasmids allowed real-time monitoring of cell lines or cultures purity overtime and overt cytotoxicity of the integrated transgenes.

Vectors and transduction strategy were optimized in Calu-3 cells. This cell line is a good model to study delivery in HAECs [30,31] and is broadly used to study CFTR ion channel properties in a human airway epithelial cell line [20]. The LVV-mediated shRNA strategy efficiently knocked-down CFTR protein expression but moderately affected CFTR function at

the electrophysiological level. Two CFTR knockdown Calu-3 cell lines have already been developed. Palmer et al. obtained strong CFTR mRNA and protein expression inhibition associated with 8-cpt-cAMP-mediated secretion decrease (>90%) following transfection with a sleeping-beauty transposon and puromycin selection [32]. Mac Vinish et al. obtained less than 5% wild-type CFTR protein content associated with a 75% decreased of cAMPdependant chloride secretion following stable transfection with siRNA oligonucleotides and clonal selection [33]. More recently, Ramachandran et al. used a reverse transfection protocol with siRNA and obtained high CFTR knock-down [22]. Protein levels were similar to those observed in this study but invalidation at the functional level was stronger. Several groups have used LVV-mediated shRNA interference in Calu-3 cells [34-37]. Knockdown efficiency is highly target- and protocol-dependent (especially siRNA sequence). Modest CFTR knockdown in our Calu-3 cell line may be due to less potent shRNA sequences, although we have selected the two more efficient ones out of six that were initially tested, or to steric hindrance in the targeted region of mRNA. It is also possible that high expression of shRNA constructs saturates cellular RNAi machinery and reduces knockdown efficiency as reported by Grimm [38]. Overexpression of AGO2 and exportin-5 proteins have been shown to enhance silencing efficiency and reduce cytotoxicity [38,39] and might improve CFTR invalidation. Finally, our sh1+sh2 cell line is not a clonal population. Generation of clonal sh1+sh2 Calu-3 cell line could have greatly improved knockdown efficiency, but our aim was to test our shRNA tool in view of its potential application in primary cultures of airway epithelial cells.

Consistent with our observations, gene silencing by RNAi is usually not complete. By targeting mRNAs, off-target effects are very likely but these are not easily identifiable. Artificial endonucleases directly target gDNA and are able to introduce silencing mutations within the cell genome, thus eliminating interference with the cellular machinery. Recently, CRISPR-Cas9 system have been developed and proposed a cost and time-effective alternative to zinc finger and transcription activator-like effector (TALE) nucleases. Off-target modification activity was not detected in the top four off-target sites confirming that CRISPR-Cas9-mediated knockdown is CFTR-specific. Furthermore, we did not detect cell toxicity albeit constitutive expression of Cas9 and sgRNA, as shown by GFP cell expression. We observed strong functional invalidation of the CFTR channel activity although not complete. Cells efficiently transduced with our LVV constructs were sorted by FACS using GFP

fluorescence. However, expression of active CRISPR-Cas9 components does not necessarily induce silencing mutations on both alleles. Therefore, TSJB1 cell line probably contains cells with one normal CFTR allele leading to a residual channel function sufficient to maintain residual CFTR-mediated currents. To circumvent this limitation, we tested a dual strategy combining shRNA expression in CRISPR-Cas9-modified Calu-3 cells. However, CFTR knockdown was not improved and transepithelial currents were abnormally enhanced in cells transduced with control vectors. Despite a residual CFTR function, the CRISPR-Cas9 CFTR knocked-down cell line represents an interesting model of CF. Indeed, CF-causing mutations from classes III to VI affect the number or the stability of normal proteins at the apical membrane of epithelial cells or the channel functionality [13]. These mutations are responsible for milder forms of CF in patients and are associated with residual CFTR function. F508del, the most common severe CF-causing mutation, is associated with protein folding defect, enhanced degradation, reduced trafficking and stability. Although the paradigm is an absence of CFTR protein at the apical membrane, few reports showed F508del-CFTR localization at the apical membrane [40–42] and residual chloride secretion function [43– 45].

Although CFTR is a chloride channel, CFTR mutations have been associated with several other phenotypes including altered cell proliferation and migration during epithelial wound repair [46–48]. However, migration and proliferation were not impaired in our CRISPR-Cas9 CFTR knocked-down Calu-3 cell line compared to control cells. CF lung disease is also characterized by deleterious inflammation and excessive secretion of inflammatory cytokines. Interestingly, we observed a significant increase of apical IL-8 release by the CRISPR-Cas9 CFTR knocked-down Calu-3 cells in absence of bacterial stimulation. These results are in accordance with previous reports of intrinsic pro-inflammatory state associated with mutated CFTR [49–52]. Non-significant difference of IL-8 secretion at the basolateral side of TSJB1 Calu-3 cells might explain the contradictory results obtained when IL-8 secretion is measured at the basolateral side of primary HAECs cultured at the air-liquid interface. Thus, our cell lines may represent interesting new *in vitro* models of polarized airway epithelial cells to investigate further the links between CFTR and signalling pathways leading to a pro-inflammatory phenotype.

High transduction efficiency and use of GFP reporter gene are particularly useful to rapidly sort high amounts of transduced cells that cannot be cultured for extended periods

of time without losing their ability to polarize and differentiate. CRISPR-Cas9 system has been developed very recently and only few references report LVV-mediated knockdown using this artificial endonuclease in primary cultures [53,54]. Here, we demonstrate that LVV-mediated CRISPR-Cas9 in primary HAECS induced high gene modification activity at the targeted locus that was associated with a decrease in the transepithelial currents inhibited by the CFTR-inhibitor Gly-H101. Interestingly, transduced HAECs could be cultured at the airliquid interface leading to a polarized epithelium, and transduction with the active TSJB1 LVV did not affect the transepithelial resistances. This protocol display several advantages. The reported high transduction efficiency and high modification frequencies reduce the number of cells from one batch that are not selected which is very important as this is precious material. In addition, the continuous expression of CRISPR-Cas9 components is particularly beneficial to introduce bi-allelic silencing mutations in the greatest number of cells, and was not associated to any cytotoxic effect. Research groups are currently working on the differentiation of induced pluripotent stem (iPS) cells into functional respiratory epithelial cells [55,56]. Modification of iPS cells with our constructs would allow selection and expansion of specific clones with known mutations. Although future research on the phenotype of these cells is mandatory, these results provide a proof of concept that primary HAECs can be targeted for CFTR gene invalidation.

Conclusion

We have generated new *CFTR* knockdown airway epithelial cell lines and demonstrated the application of the lentiviral-mediated CRISPR-Cas9 strategy in primary HAEC cultures with isogenic controls. These results represent a first step to introduce CF-specific mutations at a specific locus by co-expressing small oligonucleotides in airway epithelial cells. This approach will allow the manipulation of CFTR expression and/or monitoring of the consequences of CF-causing mutations in cells with their isogenic controls, a condition that is not reached when comparing cultures of non-CF and CF patients.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

T.H.N was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM) and IHU-Cesti, which received French government financial support managed by the National Research Agency via the "Investment into the Future" program ANR-10-IBHU-005. M.C was supported by the Swiss National Science Foundation (grant 310030-134907/1 to M.C.). J.B. was supported by a grant from "Vaincre la Mucoviscidose" to M.C. and T.H.N.

Acknowledgements

We thank Joanna Bou Saab (Laboratory of Clinical Investigation III, Geneva, Switzerland), Ludovic Wiszniewski and Song Huang (Epithelix, Plan-les-Ouates, Switzerland) and the GenoCellEdit core facility (SFR François Bonamy, Nantes, France).

Supplementary material

Supplementary figure 1 shows shRNA and CRISPR-Cas9 DNA constructs in LVV backbones and provides flow cytometric analyses of transduced Calu-3 cells and primary HAECs. Supplementary figure 2 depicts the protocol for the generation and analysis of pseudostratified human airway epithelia.

References

- Deng Y, Wang CC, Choy KW, Du Q, Chen J, Wang Q, et al. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies. Gene 2014;538:217–27. doi:10.1016/j.gene.2013.12.019.
- [2] Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. Biochem J 2012;443:603–18. doi:10.1042/BJ20120146.
- [3] Johnson LG, Olsen JC, Naldini L, Boucher RC. Pseudotyped human lentiviral vectormediated gene transfer to airway epithelia in vivo. Gene Ther 2000;7:568–74. doi:10.1038/sj.gt.3301138.
- [4] Borok Z, Harboe-Schmidt JE, Brody SL, You Y, Zhou B, Li X, et al. Vesicular stomatitis virus G-pseudotyped lentivirus vectors mediate efficient apical transduction of polarized quiescent primary alveolar epithelial cells. J Virol 2001;75:11747–54. doi:10.1128/JVI.75.23.11747-11754.2001.
- [5] Copreni E, Penzo M, Carrabino S, Conese M. Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium: a promising approach to gene therapy of cystic fibrosis. Gene Ther 2004;11 Suppl 1:S67–75. doi:10.1038/sj.gt.3302372.
- [6] Bos TJ, De Bruyne E, Heirman C, Vanderkerken K. In search of the most suitable lentiviral shRNA system. Curr Gene Ther 2009;9:192–211.
- [7] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell 2014;157:1262–78. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010.
- [8] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 2012;337:816–21. doi:10.1126/science.1225829.
- [9] Malina A, Mills JR, Cencic R, Yan Y, Fraser J, Schippers LM, et al. Repurposing CRISPR/Cas9 for in situ functional assays. Genes Dev 2013;27:2602–14. doi:10.1101/gad.227132.113.
- [10] Kaur IP, Chopra K, Rishi P, Puri S, Sharma G. Small RNAs: the qualified candidates for gene manipulation in diverse clinical pathologies. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 2014;31:305–29.
- [11] Cai M, Yang Y. Targeted genome editing tools for disease modeling and gene therapy. Curr Gene Ther 2014;14:2–9.
- [12] Schwank G, Koo B-K, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. Cell Stem Cell 2013;13:653–8. doi:10.1016/j.stem.2013.11.002.
- [13] Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. N Engl J Med 2005;352:1992–2001. doi:10.1056/NEJMra043184.
- [14] Wilke M, Buijs-Offerman RM, Aarbiou J, Colledge WH, Sheppard DN, Touqui L, et al. Mouse models of cystic fibrosis: phenotypic analysis and research applications. J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc 2011;10 Suppl 2:S152–71. doi:10.1016/S1569-1993(11)60020-9.
- [15] Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. Science 2008;321:1837–41. doi:10.1126/science.1163600.

- [16] Ostedgaard LS, Meyerholz DK, Chen J-H, Pezzulo AA, Karp PH, Rokhlina T, et al. The ΔF508 mutation causes CFTR misprocessing and cystic fibrosis-like disease in pigs. Sci Transl Med 2011;3:74ra24. doi:10.1126/scitranslmed.3001868.
- [17] Stoltz DA, Rokhlina T, Ernst SE, Pezzulo AA, Ostedgaard LS, Karp PH, et al. Intestinal CFTR expression alleviates meconium ileus in cystic fibrosis pigs. J Clin Invest 2013;123:2685– 93. doi:10.1172/JCI68867.
- [18] Sun X, Sui H, Fisher JT, Yan Z, Liu X, Cho H-J, et al. Disease phenotype of a ferret CFTRknockout model of cystic fibrosis. J Clin Invest 2010;120:3149–60. doi:10.1172/JCI43052.
- [19] Gruenert DC, Willems M, Cassiman JJ, Frizzell RA. Established cell lines used in cystic fibrosis research. J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc 2004;3 Suppl 2:191–6. doi:10.1016/j.jcf.2004.05.040.
- [20] Shan J, Huang J, Liao J, Robert R, Hanrahan JW. Anion secretion by a model epithelium: more lessons from Calu-3. Acta Physiol Oxf Engl 2011;202:523–31. doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02253.x.
- [21] Randell SH, Fulcher ML, O'Neal W, Olsen JC. Primary epithelial cell models for cystic fibrosis research. Methods Mol Biol Clifton NJ 2011;742:285–310. doi:10.1007/978-1-61779-120-8_18.
- [22] Ramachandran S, Krishnamurthy S, Jacobi AM, Wohlford-Lenane C, Behlke MA, Davidson BL, et al. Efficient delivery of RNA interference oligonucleotides to polarized airway epithelia in vitro. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2013;305:L23–32. doi:10.1152/ajplung.00426.2012.
- [23] Wiszniewski L, Jornot L, Dudez T, Pagano A, Rochat T, Lacroix JS, et al. Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from patients with cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 2006;34:39–48. doi:10.1165/rcmb.2005-01610C.
- [24] Nguyen TH, Oberholzer J, Birraux J, Majno P, Morel P, Trono D. Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes. Mol Ther J Am Soc Gene Ther 2002;6:199–209.
- [25] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat Biotechnol 2013;31:827–32. doi:10.1038/nbt.2647.
- [26] Quinton PM. Too much salt, too little soda: cystic fibrosis. Sheng Li Xue Bao 2007;59:397–415.
- [27] Trapani I, Puppo A, Auricchio A. Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies. Prog Retin Eye Res 2014. doi:10.1016/j.preteyeres.2014.08.001.
- [28] Aarbiou J, Copreni E, Buijs-Offerman RM, van der Wegen P, Castellani S, Carbone A, et al. Lentiviral small hairpin RNA delivery reduces apical sodium channel activity in differentiated human airway epithelial cells. J Gene Med 2012;14:733–45. doi:10.1002/jgm.2672.
- [29] Caci E, Melani R, Pedemonte N, Yueksekdag G, Ravazzolo R, Rosenecker J, et al. Epithelial sodium channel inhibition in primary human bronchial epithelia by transfected siRNA. Am J Respir Cell Mol Biol 2009;40:211–6. doi:10.1165/rcmb.2007-0456OC.
- [30] Florea BI, Meaney C, Junginger HE, Borchard G. Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. AAPS PharmSci 2002;4:E12. doi:10.1208/ps040312.
- [31] Forbes B, Ehrhardt C. Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV 2005;60:193–205. doi:10.1016/j.ejpb.2005.02.010.

- [32] Palmer ML, Lee SY, Maniak PJ, Carlson D, Fahrenkrug SC, O'Grady SM. Proteaseactivated receptor regulation of Cl- secretion in Calu-3 cells requires prostaglandin release and CFTR activation. Am J Physiol Cell Physiol 2006;290:C1189–98. doi:10.1152/ajpcell.00464.2005.
- [33] MacVinish LJ, Cope G, Ropenga A, Cuthbert AW. Chloride transporting capability of Calu-3 epithelia following persistent knockdown of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR. Br J Pharmacol 2007;150:1055–65. doi:10.1038/sj.bjp.0707175.
- [34] Losa D, Köhler T, Bellec J, Dudez T, Crespin S, Bacchetta M, et al. Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis in airway epithelial cells is mediated by gap junctional communication in a JNK-dependent manner. J Immunol Baltim Md 1950 2014;192:4804–12. doi:10.4049/jimmunol.1301294.
- [35] Sesma JI, Kreda SM, Okada SF, van Heusden C, Moussa L, Jones LC, et al. Vesicular nucleotide transporter regulates the nucleotide content in airway epithelial mucin granules. Am J Physiol Cell Physiol 2013;304:C976–84. doi:10.1152/ajpcell.00371.2012.
- [36] Huang J, Shan J, Kim D, Liao J, Evagelidis A, Alper SL, et al. Basolateral chloride loading by the anion exchanger type 2: role in fluid secretion by the human airway epithelial cell line Calu-3. J Physiol 2012;590:5299–316. doi:10.1113/jphysiol.2012.236919.
- [37] Engelman JA, Jänne PA, Mermel C, Pearlberg J, Mukohara T, Fleet C, et al. ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:3788–93. doi:10.1073/pnas.0409773102.
- [38] Grimm D. The dose can make the poison: lessons learned from adverse in vivo toxicities caused by RNAi overexpression. Silence 2011;2:8. doi:10.1186/1758-907X-2-8.
- [39] Börner K, Niopek D, Cotugno G, Kaldenbach M, Pankert T, Willemsen J, et al. Robust RNAi enhancement via human Argonaute-2 overexpression from plasmids, viral vectors and cell lines. Nucleic Acids Res 2013;41:e199. doi:10.1093/nar/gkt836.
- [40] Kälin N, Claass A, Sommer M, Puchelle E, Tümmler B. DeltaF508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis. J Clin Invest 1999;103:1379–89. doi:10.1172/JCI5731.
- [41] Penque D, Mendes F, Beck S, Farinha C, Pacheco P, Nogueira P, et al. Cystic fibrosis F508del patients have apically localized CFTR in a reduced number of airway cells. Lab Investig J Tech Methods Pathol 2000;80:857–68.
- [42] Borthwick LA, Botha P, Verdon B, Brodlie MJ, Gardner A, Bourn D, et al. Is CFTR-delF508 really absent from the apical membrane of the airway epithelium? PloS One 2011;6:e23226. doi:10.1371/journal.pone.0023226.
- [43] Derichs N, Mekus F, Bronsveld I, Bijman J, Veeze HJ, von der Hardt H, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-mediated residual chloride secretion does not protect against early chronic Pseudomonas aeruginosa infection in F508del homozygous cystic fibrosis patients. Pediatr Res 2004;55:69–75. doi:10.1203/01.PDR.0000100758.66805.CE.
- [44] Stanke F, Hedtfeld S, Becker T, Tümmler B. An association study on contrasting cystic fibrosis endophenotypes recognizes KRT8 but not KRT18 as a modifier of cystic fibrosis disease severity and CFTR mediated residual chloride secretion. BMC Med Genet 2011;12:62. doi:10.1186/1471-2350-12-62.
- [45] Stanke F, van Barneveld A, Hedtfeld S, Wölfl S, Becker T, Tümmler B. The CF-modifying gene EHF promotes p.Phe508del-CFTR residual function by altering protein glycosylation

and trafficking in epithelial cells. Eur J Hum Genet EJHG 2014;22:660–6. doi:10.1038/ejhg.2013.209.

- [46] Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. J Pathol 2007;211:340–50. doi:10.1002/path.2118.
- [47] Kirk KL. CFTR channels and wound healing. Focus on "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair." Am J Physiol Cell Physiol 2010;299:C888–90. doi:10.1152/ajpcell.00313.2010.
- [48] Trinh NTN, Bardou O, Privé A, Maillé E, Adam D, Lingée S, et al. Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. Eur Respir J 2012;40:1390–400. doi:10.1183/09031936.00221711.
- [49] Tabary O, Zahm JM, Hinnrasky J, Couetil JP, Cornillet P, Guenounou M, et al. Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro. Am J Pathol 1998;153:921–30. doi:10.1016/S0002-9440(10)65633-7.
- [50] Perez A, Issler AC, Cotton CU, Kelley TJ, Verkman AS, Davis PB. CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2007;292:L383–95. doi:10.1152/ajplung.00403.2005.
- [51] Vij N, Mazur S, Zeitlin PL. CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. PloS One 2009;4:e4664. doi:10.1371/journal.pone.0004664.
- [52] Hunter MJ, Treharne KJ, Winter AK, Cassidy DM, Land S, Mehta A. Expression of wildtype CFTR suppresses NF-kappaB-driven inflammatory signalling. PloS One 2010;5:e11598. doi:10.1371/journal.pone.0011598.
- [53] Koike-Yusa H, Li Y, Tan E-P, Velasco-Herrera MDC, Yusa K. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. Nat Biotechnol 2014;32:267–73. doi:10.1038/nbt.2800.
- [54] Kabadi AM, Ousterout DG, Hilton IB, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector. Nucleic Acids Res 2014. doi:10.1093/nar/gku749.
- [55] Huang SXL, Islam MN, O'Neill J, Hu Z, Yang Y-G, Chen Y-W, et al. Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. Nat Biotechnol 2014;32:84–91. doi:10.1038/nbt.2754.
- [56] Firth AL, Dargitz CT, Qualls SJ, Menon T, Wright R, Singer O, et al. Generation of multiciliated cells in functional airway epithelia from human induced pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111:E1723–30. doi:10.1073/pnas.1403470111.

Figures

Figure 1. CRISPR-Cas9 genome editing activity in transduced Calu-3 cells and primary HAECs. (A) Calu-3 cells were transduced with a dose range of CRISPR-Cas9 LVVs. Multiplicity of infection (MOI) is indicated above the diagram. A week post-transduction (PT), percentage of GFP positive cells (GFP + cells %) was determined by FACS and gDNA was extracted to perform T7E1 mismatch detection assay at the target locus in CFTR exon 2. Gene modification activity (GMA) was calculated as described in the Materials and Methods and expressed as a percentage of cleavage normalized to the percentage of GFP positive cells. (B) Frequency of gene modification was monitored during CRISPR-Cas9 Calu-3 cell line expansion on days 25 and 65 PT (D25 PT and D65 PT respectively, n=3). (C) Potential offtarget effects were investigated at four loci corresponding to the most probable genomewide off-target sites for TSJB1 sequence (n=3). The T7E1 mismatch detection assay was performed in CRISPR-Cas9 Calu-3 cells on D65 PT. (D) Primary HAECs (n=2 patients) were transduced with CRISPR-Cas9 LVVs at MOIs 2 and 10. A week PT, GFP positive cells were sorted by FACS and gDNA was extracted from this subpopulation to perform a T7E1 mismatch detection assay at the target locus of CFTR exon 2. UTC: untransduced cells, TSJB1 and 2: target sequences JB1 and JB2, OFF-TS1-4: off-target sequences 1-4, *: non-cleaved PCR product, arrow: cleaved PCR product.

Figure 2. Silencing of CFTR mRNA and protein expression by shRNA interference and CRISPR-Cas9 genome editing in polarized Calu-3 cells. shAlter and sh1+sh2 Calu-3 cells (A, C) and CTL and TSJB1 Calu-3 cells (B, D) were seeded on semi-permeable supports and cultured under submerged conditions for 14-20 days alongside non modified Calu-3 cells (UTC). (A, B) Total RNAs were extracted and CFTR mRNA abundance was quantified by RT-qPCR (n=10, 7, 6 for shRNA cell lines and n=7, 8, 8 for CRISPR-Cas9 cell lines). (B, D) Proteins were extracted and processed for western blot. CFTR protein expression was quantified by densitometry and normalized to GAPDH house-keeping gene expression (n=6, 5, 6 for shRNA cell lines and n=6, 8, 8 for CRISPR-Cas9 cell lines). Bars indicate means ± SEM. Significant difference compared to shAlter or CTL cells (p<0.05) is indicated by one or more asterisks.

Figure 3. Silencing of CFTR-mediated transepithelial currents in polarized Calu-3 cells. shAlter, sh1+sh2, CTL and TSJB1 Calu-3 cells were seeded on semi-permeable supports and cultured under submerged conditions for 14-20 days alongside non modified Calu-3 cells (UTC). (A) Representative recordings of transepithelial short-circuit currents (Isc) with CRISPR-Cas9-modified Calu-3 cells. (B, C) Transepithelial Isc was recorded in Ussing chamber device after stabilization of the monolayers (Isc_{basal}), CFTR activation by isoproterenol (Isc_{act. CFTR}) and CFTR inhibition by GlyH101 (Isc_{inh. CFTR}) (n=4, 4, 4 for shRNA Calu-3 cells and n=9, 8, 9 for CRISPR-Cas9 Calu-3 cells). (D, E) Relative fold change of the transepithelial Isc following inhibition by Gly-H101 accounts for *CFTR* knock-down at the electrophysiological level. Bars indicate means ± SEM. Significant difference compared to shAlter or CTL cells (p<0.05) is indicated by one or more asterisks. I: isoproterenol, G: Gly-H101.

Figure 4. Silencing of CFTR-mediated transepithelial currents in differentiated primary HAECs by CRISPR-Cas9 genome editing. Primary HAECs were transduced with shRNA and CRISPR-Cas9 LVVs and processed as described in Supplementary figure 2. (A, B) Transepithelial resistances were measured in Ussing chamber device to confirm primary culture polarization. (C, D) Transepithelial short-circuit current variations in response to CFTR-blocker Gly-H101 were measured in Ussing chamber device following ENaC inhibition by amiloride and CFTR activation by isoproterenol (n=5, 4 for shRNA HAECs and n=6, 7 for CRISPR-Cas9 HAECs). Bars indicate means ± SEM. Significant difference compared to shAlter or CTL cells (p<0.05) is indicated by one or more asterisks.

Figure 5. CRISPR/shRNA double knock-down in polarized Calu-3 cells. CTL and TSJB1 Calu-3 cells were transduced with shAlter and sh1+sh2 LVVs respectively (MOI 10), expanded and finally cultured on semi-permeable supports under submerged conditions for 14-20 days. (A) CFTR mRNA abundance was measured by RT-qPCR (n=4). (B) Western blot analysis of the CFTR protein content was performed by densitometry and normalization to GAPDH house-keeping gene expression (n=4). (C, D) Transepithelial short-circuit currents (Isc) were measured in Ussing chamber device after stabilization of the monolayers (Isc_{basal}), CFTR activation by isoproterenol (Isc_{act. CFTR}) and CFTR inhibition by the Gly-H101 blocker (Isc_{inh. CFTR}) (n=5). (E) CFTR inhibition is depicted as a relative fold change of the transepithelial Isc following inhibition by Gly-H101. Bars indicate means ± SEM. Statistical significance

compared to CTL/shAlter cells (p<0.05) is indicated by one or more asterisks. I: isoproterenol, G: Gly-H101.

Figure 6. Characterization of CRISPR-Cas9-modified Calu-3 cells. (A) To assess their migration and proliferation profile, CTL and TSJB1 Calu-3 cells were seeded in ibidi inserts. Gap area was photographed when the inserts were removed (t=0h) and at the end of the experiment (t=15h). Images were merged and pixels in the non-repaired area were counted. Results are indicated as a ratio of pixel numbers (n=10 and 11). (B) At the end of the experiment, cells were stained with the nuclear proliferation marker Ki-67 and DAPI. Pictures were taken in n=5 areas (n=5 inserts for a total of n=25). Results are indicated as a ratio of Ki-67 positive cells/DAPI positive cells. (C, D) Basal IL-8 secretion was measured in apical (C) and basolateral (D) supernatants from CRISPR Calu-3 cells (n=6) by ELISA and normalized to total protein amounts. Fold change of total IL-8 secretion is expressed compared to untransduced (UTC) cells. Bars indicate means ± SEM. Statistical significance compared to CTL cells (p<0.05) is indicated by one or more asterisks.

Figure 1













Figure 3














0.5

0.0

UTC

ст́ь

TSJB1



Supplementary materials

Supplementary figure 1. Generation of CFTR knocked-down Calu-3 cell lines and primary human airway epithelial cells (HAECs). (A) DNA constructs in a lentiviral vector (LVV) backbone used to induce CFTR gene knock-down. shRNA constructs (1) contain a shRNA sequence targeting CFTR mRNA (sh1, sh2 or sh3) or a non-specific sequence (shAlter) and the eGFP reporter cDNA sequence. CRISPR constructs (2) contain the expression cassette of Cas9 endonuclease fused to HA tag and eGFP cDNA sequence. The 20 nucleotide sequences targeting CFTR exon 2 (TS) were cloned upstream the sgRNA sequence. The CRISPR control plasmid (CTL) (3) only expressed the Cas9-HA-eGFP cassette. (B) Flow cytometric analyses of transduced Calu-3 cells and primary HAECs. Calu-3 cells were transduced with shRNA LVVs at MOI 10 and CRISPR LVVs at MOI 2. Numerical values indicate the percentage of GFP positive cells. Primary HAECs were transduced with shRNA and CRISPR LVVs at MOI 10. Numerical values indicate the percentage of GFP positive cells (means \pm SEM, n=5-6). EF1 α : elongation factor 1 α , SFFV: spleen focus forming virus, eGFP: enhanced green fluorescent protein, shRNA: short hairpin RNA, sgRNA: single-guide RNA, HA: hemagglutinin, WPRE: Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element, U3RU5: HIV-1-derived selfinactivating long terminal repeat (LTR), ΔU3RU5: HIV-1-derived self-inactivating LTR containing U3 depleted of viral enhancer and promoter, ϕ : packaging signal.



в



Supplementary figure 2. Protocol for the generation and analysis of pseudo-stratified human airway epithelia. FACS: flow cytometry and cell sorting, ALI: air-liquid interface.



DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse avait pour objectif la mise au point d'un protocole d'invalidation du gène *CFTR* dans des cellules épithéliales respiratoires primaires humaines saines afin d'obtenir un modèle cellulaire de la mucoviscidose. Ce modèle devait ensuite permettre d'étudier la composante *CFTR* de la réponse inflammatoire liée à l'IL-8 et celle de la réparation de lésions épithéliales faisant intervenir la migration et la prolifération cellulaire. Pour cela, deux stratégies de modification de l'expression génétique ont été testées et comparées pour leurs capacités à mimer le défaut du canal chlore AMPc-dépendant. La première stratégie est basée sur l'interférence ARN et l'expression de séquences shRNA CFTR-spécifiques. La seconde stratégie utilise la technologie des endonucléases artificielles CRISPR-Cas9 pour muter le gène d'intérêt.

Dans un premier temps, les protocoles ont été développés et les stratégies validées dans la lignée des cellules glandulaires sous-muqueuses Calu-3. Ces cellules présentent en effet un haut niveau d'expression de la protéine CFTR et ont la particularité de former une moncouche de cellules polarisées formant des jonctions serrées et possédant une résistance transépithéliale qui permet la mesure des courants ioniques. Deux modèles Calu-3 *CF-like* ont été générés qui présentent un phénotype différent. L'étude du modèle généré grâce à la stratégie CRISPR-Cas9 n'a pas montré de différence concernant les propriétes de migration et de prolifération des cellules. Cependant, l'expression basale de la cytokine IL-8 est augmentée dans les Calu-3 CF soutenant l'hypothèse d'un lien direct entre le défaut du gène *CFTR* et la composante inflammatoire de la pathologie.

Les protocoles ont ensuite été appliqués à des cellules épithéliales respiratoires humaines saines. Cultivées sur des supports semi-perméables, ces cellules forment un épithélium pseudo-stratifié différencié très proche de l'épithélium *in vivo*. Seule la stratégie d'invalidation de gène utilisant le système CRISPR-Cas9 a permis d'obtenir une inhibition fonctionnelle du gène *CFTR*. Bien que des optimisations soient nécessaires, ce modèle cellulaire de la mucoviscidose permettra de carcatériser les conséquences d'un défaut du gène *CFTR* en l'absence d'une infection et d'une inflammation pré-existantes, et en s'affranchissant de la composante génotypique grâce à la présence de contrôles isogéniques.

La première stratégie développée fut celle de l'interférence ARN. De multiples études ont confirmé le fort potentiel d'invalidation des petits ARN interférents aussi bien dans des cellules eucaryotes que pour la mise au point de modèles animaux transgéniques^{301–303}, ce qui se traduit depuis quelques années par la mise en place de plusieurs essais thérapeutiques pour des pathologies diverses^{253,304,305}. Cependant, toutes les séquences ARN interférentes ne se valent pas et les résultats peuvent varier de façon plus ou moins importante selon le type de structure et le système d'expression. Ceci rend nécessaire le test d'un grand nombre de séquences pour chaque cible génétique. La stratégie de l'interférence ARN a déjà été utilisée pour la mise au point de modèles cellulaires de la mucoviscidose^{299,300,306}. Palmer et al. notamment ont obtenu une invalidation quasi-totale dans les cellules Calu-3 en utilisant une structure shRNA. Nous avons donc choisi d'utiliser cette séquence validée comme point de départ de nos travaux. Cependant, la vérification de son potentiel d'invalidation dans les cellules Calu-3 n'a pas reproduit les résultats publiés précédemment. Malgré que la séquence cible soit identique, notre système d'expression est différent de celui utilisé dans la publication originale (expression stable grâce à un transposon et sélection par la puromycine). Il semble donc que la nature du système exprimant la ou les séquences shRNA joue un rôle particulier dans le niveau d'invalidation génétique.

Lors de la recherche de nouvelles séquences cibles shRNA, plusieurs critères ont été pris en compte. Le premier niveau de critères a été fixé pour la recherche de séquences par le logiciel de GenelinkTM (taille et structure primaire). Les résultats obtenus par l'algorythme ne contenaient pas les séquences publiées par Palmer *et al*³⁰⁰. ou par Ramachandran *et al*.²⁹⁹ ce qui témoigne de la variété de séquences analysables. Le second niveau a été déterminé pour réduire le nombre de séquences à tester et prenait en compte la spécificité et la présence de variations pour limiter les effets *off*. Cependant, ces critères ne permettent pas de prédire les interactions dans le contexte d'une structure secondaire. Les séquences ont fait l'objet d'une première validation par transfection dans des cellules BHK exprimant le *CFTR* et les cellules Calu-3 sous forme de siRNA. Seule une séquence sur les six testées a montré une efficacité plus faible que les autres qui présentaient des niveaux d'inhibition assez similaires. Cependant, lorsque trois de ces séquences ont été testées sous forme de shRNA intégrés au génome des cellules Calu-3 après transduction, seule la combinaison des séquences 1 et 2 a

induit une inhibition de l'expression protéique corrélée à une diminution de la réponse du canal CFTR à son activation par augmentation de l'AMPc intra-cellulaire. Les paramètres expérimentaux peuvent donc être à l'origine de grandes variations dans les résultats, ce qui confirme l'importance du criblage de plusieurs séquences dans les conditions définies pour le projet c'est-à-dire le type d'oligos, le sytème d'expression et les conditions de culture.

Cette observation a trouvé une autre confirmation dans les résultats obtenus avec la culture primaire. En effet, nous n'avons pas observé d'invalidation, ni au niveau de l'expression protéique ni au niveau électrophysiologique, en utilisant les mêmes vecteurs lentiviraux et le même protocole que pour la génération des lignées cellulaires Calu-3. Trois séries d'infection ont été réalisées mais toutes n'ont pas permis d'obtenir des filtres utilisables pour les éxpériences de caractérisation. Ceci souligne la difficulté du protocole appliqué aux cellules primaires notamment en termes de synchronisation. Il existe en effet des fenêtres d'« intervention » précises pour obtenir un taux élévé de transduction ou pour obtenir un nombre de cellules à trier le plus important possible sachant qu'une confluence trop élevée a un impact négatif sur les cultures. Néanmoins, plusieurs filtres ont pu être analysés y compris en histologie et en immunohistochimie. Ces analyses ont montré la persistence de l'expression de la protéine GFP et une morphologie générale confirmant la différenciation en un épithélium pseudo-stratifié mucocilié (Figure 27). Ces observations confirment la faisabilité de notre protocole et l'absence de cytotoxicité liée à l'expression des séquences shRNA. De plus, cette stratégie a été utilisée avec succès pour une autre cible, le gène GJB2 codant pour la protéine des jonctions communicantes Connexin 26, comme en témoigne l'inhibition significative au niveau transcriptionnel (-77% d'ARNm, Annexe 2)³⁰⁷. L'ensemble de ces résultats confirment donc que le succès d'une stratégie d'invalidation par intéférence ARN dans un type de culture ne présage pas de son succès en utilisant les mêmes outils dans un type de culture différent, et que l'efficacité d'invalidation peut varier de façon plus ou moins importante selon la cible. Plusieurs études ont montré que l'efficacité d'invalidation d'une séquence ARN interférente varie fortement en fonction du type cellulaire ou encore du fond génétique^{308,309}. Les cellules primaires utilisées pour ces expériences et la lignée Calu-3 n'ont pas la même origine cellulaire (cellules épithéliales vs. cellules glandulaires) ni le même fond génétique. Le niveau d'expression endogène du CFTR est également différent. Il est donc possible que la machinerie des cellules primaires n'ait pas réagi de manière identique à celle des cellules Calu-3 et que certaines limitations aient été exacerbées, par exemple celle de la saturation des protéines de la voie de synthèse des shRNA³¹⁰.



<u>Figure 27</u> : Epithélium primaire différencié modifié par transduction avec des vecteurs lentiviraux exprimant des séquences shRNA CFTR-spécifiques en microscopie confocale.

Afin de potentialiser l'effet des trois séquences shRNA choisies, une construction triple permettant leur expression sous le contrôle de promoteurs différents a été clonée. Plusieurs équipes ont en effet décrit l'invalidation de cibles génétiques multiples et une augmentation de l'efficacité d'inhibition en utilisant un système d'expression multiple^{311–315}. Pourtant, nous n'avons pas obtenu de tels résultats avec notre plasmide triple. De plus, les titres obtenus pour la production de vecteurs lentiviraux étaient plus faibles que pour les autres constructions. Bien que cela puisse être du à la taille plus importante du transgène, d'autres indices semblent indiquer un effet négatif sur l'expression et la croissance cellulaire. En effet, l'intensité de fluorescence mesurée lors du tri par FACS était beaucoup plus faible et la lignée obtenue proliférait peu. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Une saturation importante de la machinerie cellulaire peut provoquer une cytotoxicité avérée qui se traduit alors par un ralentissement de la prolifération ou d'autres fonctions cellulaires et une faible éfficacité des séquences shRNA. La faible intensité de fluorescence et l'invalidation plus faible du gène CFTR peuvent aussi provenir d'une mauvaise expression du transgène intégré causée par une gêne stérique et/ou des interactions entre les promoteurs empêchant une transcription optimale comme cela a été décrit par Curtin et al.³¹⁶ Afin de réduire ces interactions, une optimisation de la construction multiple pourrait consister en l'expression des séquences shRNA sous forme de polyprotéine ou séparées par des peptides 2A.

Face aux effets délétères de la construction multiple, l'expression de plusieurs séquences shRNA a été induite par co-transduction des cellules avec les vecteurs lentiviraux shRNA. Seule la combinaison des séquences 1 et 2 a permis l'obtention d'un phénotype CF aux

niveaux post-transcriptionnel et fonctionnel dans les cellules Calu-3. Cependant, ce phénotype reste modéré. Les vecteurs lentiviraux shRNA contiennent tous le gène rapporteur de la GFP. Il n'est donc pas possible de savoir si toutes les cellules de la population contiennent au moins une copie de chacune des deux séquences. Afin d'optimiser cette stratégie et potentiellement le niveau d'invalidation du gène *CFTR*, plusieurs options sont envisageables : l'utilisation de gènes rapporteurs différents pour chaque séquence shRNA, l'adaptation de la construction multiple pour l'expression des séquences 1 et 2 uniquement (sous contrôle de promoteurs différents ou sous contrôle d'un même promoteur mais séparées par un peptide 2A) et/ou l'isolation de clones cellulaires. Une seconde lignée cellulaire invalidée pour le *CFTR* a été développée grâce au système CRISPR-Cas9 et présente un phénotype CF plus marqué. L'optimisation de la lignée cellulaire exprimant les séquences shRNA ne devrait donc être envisagée que dans l'optique de son utilisation sous forme d'un système inductible qui permettrait une invalidation réversible du gène *CFTR*.

La seconde stratégie développée fut celle de l'édition de gène grâce aux endonucléases de type CRISPR-Cas9. Cette stratégie a permis d'obtenir une nouvelle lignée Calu-3 immortalisée invalidée pour le gène *CFTR* ainsi qu'une invalidation fonctionnelle dans des cultures primaires de cellules épithéliales respiratoires différenciées à l'interface air-liquide. Quelques techniques de détection du CFTR par FACS existent mais, à ce jour, il n'est pas possible de trier des cellules en fonction du niveau d'expression membranaire du canal CFTR puis de les remettre ensuite en culture. Notre système d'expression permet d'isoler les cellules exprimant la GFP et donc les composants du système CRISPR-Cas9. Grâce à l'intégration de l'endonucléase Cas9 et du brin guide ciblant l'exon 2 du *CFTR* au génome des cellules hôtes lors de la transduction, leur expression stable pemet d'augmenter leur temps d'action et ainsi l'efficacité d'invalidation à l'échelle de la population toute entière. Cet effet a pu être observé lors de la génération de la lignée CF Calu-3 à travers la diminution de l'expression protéique au cours des premières semaines de prolifération. Il est particulièrement bénéfique dans le cadre des cultures primaires pour lesquelles nous ne pouvons pas envisager une sélection clonale.

L'expression continue des composants du sytème CRISPR-Cas9 ne semble pas poser de problèmes en termes de cytotoxicité ou d'activité nucléasique non-spécifique. En effet, l'expression de la GFP reste stable depuis l'isolement par FACS des cellules Calu-3 positives, la prolifération cellulaire ne semble pas affectée et aucun effet *off* n'a été détecté dans les quatre sites les plus probables déterminés par l'algorythme de Hsu *et al.*³¹⁷ 65 jours après transduction. Cependant, il serait judicieux de surveiller ces paramètres au cours du temps ainsi que le niveau d'invalidation du gène *CFTR* dans la lignée Calu-3 CF. En cas d'altération de ces propriétés, la simplicité du protocole permettra la génération rapide d'une nouvelle lignée cellulaire CF.

Pour limiter l'expression stable de l'endonucléase Cas9, deux solutions peuvent être envisagées. La première consiste en l'utilisation de vecteurs lentiviraux déficients pour l'intégration (IDLV). Ces vecteurs contiennent une mutation de l'enzyme integrase qui empêche l'intégration du génome viral. Le transgène est alors exprimé à partir de formes épisomales. Les autres propriétés des vecteurs lentiviraux dérivés du HIV-1 sont conservées³¹⁸. Pour ce projet, nous avons montré que l'introduction de mutations invalidantes sur les deux copies du gène CFTR et l'obtention d'une inhibition conséquente dans une population de cellules exprimant le système CRISPR-Cas9 requiert un temps d'action long. L'utilisation d'IDLV implique la perte du transgène au cours des divisions. Les cellules exprimant la GFP devront donc être triées de façon récurrente et le niveau d'expression de la protéine CFTR mesuré après chaque tri. Lorsque l'invalidation à l'échelle de la population sera jugée suffisante, les cellules pourront être amplifiées et les divisions assureront la dilution du transgène et donc des cellules exprimant l'endonulcéase Cas9. La seconde solution consiste à utiliser un sytème « Tet-on » afin d'exprimer l'un des deux composants du système CRISPR-Cas9 sous le contrôle d'un promoteur inductible, notamment l'endonucléases Cas9 pour des raisons évidentes. Une fois le niveau d'invalidation requis atteint, l'expression de la nucléase peut être réprimée par arrêt du traitement à la tétracycline ou à l'un de ses analogues. Cette stratégie doit tenir compte de ce traitement et aux possibles effets secondaires ou interactions sur les analyses réalisées. En effet, plusieurs études ont démontré un effet de la doxycycline et de la minocycline sur les voies de l'inflammation ou les transports ioniques^{319–321}.

La mise en place de telles stratégies doit être mûrement réfléchie. La stratégie des IDLV semble la plus adaptée pour la génération d'une nouvelle lignée Calu-3 CF sans expression stable du système CRISPR-Cas9. En effet, seule cette option permet une modification stable du génome sans aucune intégration d'un transgène exogène. Celle-ci serait particulièrement envisageable dans le cas d'une toxicité à long terme et d'une perte des caractéristiques initiales de la lignée cellulaire déjà disponible. Cependant, cette stratégie n'est applicable qu'aux systèmes cellulaires dont les propriétés prolifératrices ne sont pas limitées. Concernant les cultures primaires, seule la stratégie « Tet-on » peut être considérée. Lors des premières expériences réalisées, les épithéliums différenciés ont été caractérisés après une période de culture à l'interface air-liquide d'environ 40 jours soit approximativement 8 semaines post-transduction. Dans l'hypothèse d'une stratégie « Tet-on », le traitement à la doxycycline ou à l'un de ses analogues devra être suivi pendant une période semblable mais les analyses devront être faites plus tardivement pour éviter toute interférence du traitement. Ce nouveau protocole nécessitera la mise au point des concentrations et du temps de traitement. Jusqu'à présent, nous n'avons pas observé de différence entre les cellules non transduites et les cellules exprimant seulement l'endonucléase. De même, l'expression conjointe du brin guide et de la Cas9 ne semble pas altérer la qualité des cultures primaires comparées aux cultures contrôles. L'utilisation du système inductible ne devrait donc être envisagée que dans le cas de cultures longues (> 2-3 mois) et d'une toxicité avérée.

La stratégie d'invalidation de gène grâce au système CRISPR-Cas9 a permis le développement d'une lignée Calu-3 présentant une forte inhibition tant au niveau protéique qu'au niveau électrophysiologique. Bien que l'invalidation du *CFTR* ne soit pas totale dans cette population cellulaire, ce modèle reste particulièrement intéressant puisqu'il reproduit les formes modérées de mucoviscidose pour lesquelles il existe une activité résiduelle. Comme rapporté dans l'article présenté dans la partie « Résultats et conclusions », une double stratégie associant le système CRISPR-Cas9 à l'expression de séquences shRNA ciblant l'ARNm CFTR a été testée dans les cellules Calu-3. Cette stratégie a été envisagée afin de réduire l'expression résiduelle du *CFTR*. Ne s'agissant pas d'une population clonale, cette expression est certainement due à la présence de cellules dont l'une ou les deux copies du gène n'ont pas été mutées ou dans lesquelles les mutations introduites sont sans effet sur

l'expression d'une protéine fonctionnelle. La lignée Calu-3 CF développée grâce à la stratégie de l'interférence ARN démontre que l'association des séquences 1 et 2 permet une invalidation partielle du CFTR. Si l'expression du CFTR est normale dans les cellules modifiées par le système CRISPR-Cas9, l'expression des séquences shRNA devrait permettre une réduction de cette expression à des niveaux comparables à ceux de la lignée générée avec les shRNA. Dans le cas où l'expression est déjà réduite grâce au système CRISPR-Cas9, l'expression résiduelle devrait pouvoir être contenue par les séquences interférentes. Ainsi, nous espérions noter une inhibition accrue à l'échelle de la population. Cependant, et de façon surprenante, la double stratégie n'a pas permis d'améliorer l'efficacité d'invalidation du gène CFTR ni au niveau post-transcriptionnel ni au niveau fonctionnel. Les systèmes d'expression utilisés pour les deux stratégies contiennent le gène rapporteur de la GFP afin de permettre le tri des cellules effectivement infectées. La lignée Calu-3 CF générée avec le système CRISPR-Cas9 est donc 100% GFP-positive. Il n'est donc pas possible de savoir quelles cellules ont été efficacement ciblées lors de la transduction avec les vecteurs lentiviraux shRNA et, si tel est le cas, quelle(s) séquence(s) est/sont exprimée(s). L'utilisation de gènes rapporteurs différents pour chaque plasmide d'expression permettrait d'isoler les cellules exprimant à la fois les composants CRISPR-Cas9 et les deux séquences shRNA afin d'étudier plus précisément l'effet de la double sratégie. Cependant, nous avons constaté que les courants ioniques transépithéliaux étaient plus élevés dans les cellules de la double sratégie que dans les cellules des lignées CRISPR-Cas9. En effet, les courants mesurés après activation et inhibition du canal CFTR sont comparables pour les cellules non-transduites (UTC), tandis que les courants mesurés dans les cellules CTL transduites avec le vecteur lentiviral shAlter et les cellules TSJB1 transduites avec les vecteurs lentiviraux sh1 et sh2 sont fortement augmentés comparés à ceux mesurés dans les cellules CTL et TSJB1 (Figures 3C et 5D de l'article, pages 140 et 142). De plus, bien que l'invalidation au niveau fonctionnel soit équivalente (-80% de réponse à l'inhibition par Gly-H101 dans les cellules TSJB1 et TSJB1/sh1+sh2 comparées aux cellules CTL et CTL/shAlter respectivement), la différence de réponse des cellules TSJB1/sh1+sh2 à l'inhibiteur Gly-H101 par rapport aux cellules non transduites est beaucoup plus faible que celle observée dans la stratégie CRISPR-Cas9 simple. Ces observations démontrent que la transduction avec les vecteurs lentiviraux shRNA a un impact non négligeable sur l'expression du canal CFTR fonctionnel et ne sont donc pas en faveur de l'utilisation d'une double stratégie.

Les dernières mesures des caractéristiques de la lignée Calu-3 CF générée grâce au système CRISPR-Cas9 ont été réalisées environ trois mois après transduction. Il est possible que le niveau d'invalidation du gène *CFTR* puisse encore augmenter au cours du temps. Le phénotype de la lignée devrait donc être vérifié de façon régulière. Une sélection clonale devrait permettre d'obtenir des lignées au phénotype stable.

Appliquée à la culture primaire de cellules épithéliales respiratoires humaines, la stratégie d'édition de gène avec le système CRISPR-Cas9 a permis d'invalider le gène *CFTR* au niveau fonctionnel. Les résultats présentés dans ce manuscrit sont issus d'une première expérience d'invalidation dans ce type cellulaire. Le protocole de modification est similaire à celui utilisé pour la stratégie de l'interférence ARN. Les mêmes difficultés concernant la délicatesse des cultures et la synchronisation des étapes ont pu être observées. Cependant, plusieurs filtres ont été obtenus et possédaient une résistance transépithéliale permettant la mesure des courants de court-circuit et témoignant d'un état polarisé. L'invalidation du *CFTR* a été mesurée au niveau électrophysiologique comme le montrent la différence des courants mesurés dans les cellules exprimant l'endonucléase Cas9 et le brin guide ciblant le *CFTR* comparées aux cellules contrôles, et les très faibles réponses à l'activation et l'inhibition du canal.

De nouvelles expériences ont été planifiées afin de confirmer ces premiers résultats et de vérifier le phénotype CF au niveau protéique. L'efficacité de transduction lors de la première expérience était particulièrement élevée et a soulevé la question de la nécessité d'une étape de tri par FACS. Bien que cette étape soit essentielle pour obtenir une population la plus pure possible, il serait intéressant de comparer des filtres issus d'un protocole parallèle avec ou sans FACS afin de confirmer l'utilité de cette étape et d'évaluer d'éventuels effets délétères sur les suites de la culture. La différenciation des cellules en un épithélium pseudo-stratifié mucocilié devra également être validée par histologie et immunohistochimie. L'activité nucléasique non-spécifique de notre système d'expression CRISPR-Cas9 devra être mesurée au moment de l'analyse pour écarter la présence d'effets *off*. Enfin, le protocole de culture primaire utilisé permet de maintenir les cellules épithéliales respiratoires humaines dans un état différencié pendant plusieurs mois. Il serait donc intéressant de maintenir ces

cultures sur une période supérieure à 40 jours afin d'augmenter le temps d'action des nucléases et de vérifier si le phénotype CF peut être éxacerbé.

La mise au point de ces nouveaux modèles cellulaires de la mucoviscidose a pour but d'étudier l'influence du défaut du gène *CFTR* sur différents paramètres, comme l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 ou la migration et la prolifération cellulaire lors de la réparation de l'épithélium, en absence d'un cycle d'infection et d'inflammation pré-existant et dans un contexte génétique identique.

Les premières études ont été réalisées avec la lignée Calu-3 CF générée grâce au système CRISPR-Cas9. Nous n'avons pas observé de différences dans les propriétés de prolifération et de migration des cellules *CF-like* comparées aux cellules contrôles non transduites ou exprimant uniquement l'endonucléase Cas9. Si certaines études confiment cette observation pour la prolifération¹²¹, plusieurs équipes ont montré un effet négatif du défaut du gène *CFTR* sur la migration de ces cellules^{120,121}. Concernant le phénotype inflammatoire de cette lignée, une augmentation de la sécrétion d'IL-8 en absence de toute stimulation par des pathogènes a été observée au niveau apical mais pas au niveau basal. Le résultat de la sécrétion apicale tend donc à confimer l'activation de la voie de sécrétion de l'IL-8 par la protéine CFTR reste controversé et n'est pas toujours observé dans des cultures primaires. Ces différences peuvent s'expliquer par les variations de protocole expérimental et/ou de facteurs épigénétiques propres à chaque patient. Nos résultats concernant la sécrétion d'IL-8 et pourraient expliquer les discordances de la littérature.

Ces propriétés seront étudiées dans notre modèle de cultures primaires CF dès lors que celles-ci seront validées. Cette étude devra également être approfondie par la mesure de la sécrétion en réponse à une stimulation des cellules par des souches de *P. aeruginosa*. Enfin, des études menées dans l'équipe du Dr Marc Chanson ont montré une suractivation des protéines kinases JNK après inhibition pharmacologique du canal CFTR tandis que la correction du défaut du gène *CFTR* dans une lignée respiratoire F508del/F508del (cellules

 CF_{15}) en utilisant un vecteur adénoviral a induit une réduction de son activité (Annexe 1)³²². Or, les protéines kinases JNK sont impliquées dans la voie de la réponse inflammatoire via la voie d'activation AP-1 et participent à l'initiation de la transcription de facteurs proinflammatoires, notamment l'IL-8. Les nouveaux modèles CF développés ici devraient permettre d'approfondir l'étude des mécanismes liant le défaut du gène *CFTR* et la voie de signalisation de ces kinases.

Conclusion et perspectives générales

Ces trois années de thèse ont permis la mise au point d'une lignée Calu-3 CF immortalisée et d'un protocole d'invalidation stable du gène *CFTR* dans les cellules épithéliales respiratoires humaines primaires grâce à une stratégie d'édition de gène utilisant les endonucléases artificielles CRISPR-Cas9. Ces modèles présentent une invalidation importante du gène *CFTR* avec une inhibition de 80% des courants chlore transépithéliaux CFTR-dépendants et miment donc une forme modérée de la pathologie. Les premières études tendent à confirmer un état pro-inflammatoire intrinsèque au défaut du *CFTR* qui doit être validé par des études complémentaires dans les cultures primaires *CF-like*. De même, le rôle du *CFTR* dans la réparation de l'épithélium reste à préciser. En plus de l'étude de ces facteurs, il serait intéressant de procéder à une analyse génomique de population de cellules primaires invalidées grâce à une puce à ADN pour mettre en évidence d'autres variations d'expression génétique éventuelles liées au défaut du gène *CFTR*. De plus, plusieurs solutions sont envisageables pour augmenter le niveau d'invalidation et potentiellement parvenir à une inhibition totale de l'expression du *CFTR* (sélection clonale, augmentation du temps d'action des nucléases).

Ces modèles sont disponibles pour la communauté scientifique et pourront être utilisés pour des applications variées comme la compréhension de mécanismes moléculaires ou de voies de signalisation particulières, des études électrophysiologiques (par exemple sur le rôle du canal CFTR et du transport des ions HCO₃⁻ encore mal compris) ou bien des étapes préliminaires pour tester des approches thérapeutiques potentielles. Pour cette dernière application, il faudra néanmoins tenir compte du mode d'action de ces traitements

éventuels. En effet, nos modèles cellulaires correspondent à une population globale dans laquelle les mutations induites ne sont pas connues précisément et sont certainement très variées. L'étude de traitements potentiateurs du canal CFTR ne sera sans doute pas envisageable à l'inverse de traitements qui concerneraient plutôt l'activation de canaux chlore différents du CFTR, l'inhibition de l'activité hyperinflammatoire ou encore le remplacement du gène muté.

Enfin, les outils moléculaires développés au cours de ce projet permettent d'envisager le développement de lignées cellulaires Calu-3 comportant des mutations spécifiques de la mucoviscidose, notamment la mutation F508del, la plus fréquente. En effet, l'apport d'un ADN donneur lors de la génération de cassures double brin par des endonucléases permet d'envisager son intégration dans le locus ciblé par recombinaison homologue. Cet ADN donneur peut prendre la forme d'un petit déoxyoligonucléotide contenant une mutation particulière associée à la mucoviscidose. Cette technique nécessite l'isolation de clones cellulaires pour séquençage et validation du génotype et ne sera donc pas envisageable pour des cultures primaires classiques. Le développement du champ de recherche sur les cellules iPS pourrait apporter une solution à ce problème. En effet, ces cellules pourraient être modifiées et chaque clone caractérisé individuellement. Seuls les clones comportant la ou les mutations voulues seraient ensuite amplifiés de façon continue. Cependant, les protocoles de différenciation de ces cellules souches en cellules épithéliales respiratoires différenciées nécessitent encore un travail considérable.

BIBLIOGRAPHIE

- 1. Wiuf, C. Do delta F508 heterozygotes have a selective advantage? *Genet. Res.* **78**, 41–47 (2001).
- 2. Morral, N. *et al.* The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat. Genet.* **7**, 169–175 (1994).
- 3. Fanconi et al. Das coeliakiesyndrom bei angeborener zysticher pankreasfibromatose und bronchiektasien. *Wien Med Wschr* **86**, 753–756 (1936).
- 4. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathologic study. *Am. J. Dis. Child.* **56**, 344–399 (1938).
- 5. Farber, S. Pancreatic Insufficiency and the Celiac Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **229,** 653–657 (1943).
- 6. Di Sant'agnese, P. A., Darling, R. C., Perera, G. A. & Shea, E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* **12**, 549–563 (1953).
- Gibson, L. E. & Cooke, R. E. A Test for Concentration of Electrolytes in Sweat in Cystic Fibrosis of the Pancreas Utilizing Pilocarpine by Iontophoresis. *Pediatrics* 23, 545–549 (1959).
- 8. Shwachman, H. & Mahmoodian, A. Pilocarpine iontophoresis sweat testing results of seven years' experience. *Bibl. Paediatr.* **86**, 158–182 (1967).
- 9. LeGrys, V. A. Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations. *J. Pediatr.* **129**, 892–897 (1996).
- 10. Knowles, M., Gatzy, J. & Boucher, R. Increased Bioelectric Potential Difference across Respiratory Epithelia in Cystic Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **305**, 1489–1495 (1981).
- 11. Quinton, P. M. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* **301**, 421–422 (1983).
- 12. Tsui, L. C. *et al.* Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* **230**, 1054–1057 (1985).
- 13. Rommens, J. M. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**, 1059–1065 (1989).
- 14. Riordan, J. R. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066–1073 (1989).
- 15. Kerem, B. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**, 1073–1080 (1989).
- 16. Anderson, M. P. *et al.* Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* **253**, 202–205 (1991).
- 17. Cystic Fibrosis Mutation Database. at http://www.genet.sickkids.on.ca/app
- 18. CFTR2. CFTR2 mutation list 22 July 2013. (2013).
- 19. Chomel, J. C., Haliassos, A., Tesson, L., Kaplan, J. C. & Kitzis, A. Frequency of the major CF mutation in French CF patients. *Hum. Genet.* **85**, 397–398 (1990).
- 20. Population variation of common cystic fibrosis mutations. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Hum. Mutat.* **4**, 167–177 (1994).
- 21. Estivill, X., Bancells, C. & Ramos, C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum. Mutat.* **10**, 135–154 (1997).
- 22. Zielenski, J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* **67**, 117–133 (2000).
- 23. Amaral, M. D. & Farinha, C. M. Rescuing mutant CFTR: a multi-task approach to a better outcome in treating cystic fibrosis. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 3497–3508 (2013).

- 24. Cutting, G. R. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1214**, 57–69 (2010).
- 25. Gallati, S. Disease-modifying genes and monogenic disorders: experience in cystic fibrosis. *Appl. Clin. Genet.* **7**, 133–146 (2014).
- 26. Collaco, J. M. & Cutting, G. R. Update on gene modifiers in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **14**, 559–566 (2008).
- 27. Drumm, M. L., Ziady, A. G. & Davis, P. B. Genetic variation and clinical heterogeneity in cystic fibrosis. *Annu. Rev. Pathol.* **7**, 267–282 (2012).
- 28. Hodson, M., Bush, A. & Geddes, D. Cystic Fibrosis, Third Edition. (CRC Press, 2007).
- 29. O'Sullivan, B. P. & Freedman, S. D. Cystic fibrosis. Lancet 373, 1891–1904 (2009).
- 30. Girodon-Boulandet, E. & Costa, C. Génétique de la mucoviscidose. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie* **8**, 126–134 (2005).
- Programme, W. H. O. C. D. and H. P. H. G. The Molecular Genetic Epidemiology of Cystic Fibrosis: Report of a Joint Meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)A/ECFS, Genoa, Italy, 19 June 2002. (Human Genetics Programme, Chronic Diseases and Health Promotion, World Health Organization, 2004).
- 32. Registre Français de la Mucoviscidose. Bilan des données 2012. (2012).
- 33. Farriaux, J. P., Vidailhet, M., Briard, M. L., Belot, V. & Dhondt, J. L. Neonatal screening for cystic fibrosis: France rises to the challenge. *J. Inherit. Metab. Dis.* **26**, 729–744 (2003).
- 34. Munck, A., Dhondt, J.-L., Sahler, C. & Roussey, M. Implementation of the French nationwide cystic fibrosis newborn screening program. *J. Pediatr.* **153**, 228–233, 233.e1 (2008).
- 35. Sermet-Gaudelus, I. *et al.* [French guidelines for sweat test practice and interpretation for cystic fibrosis neonatal screening]. *Arch. Pédiatrie Organe Off. Sociéte Fr. Pédiatrie* **17**, 1349–1358 (2010).
- 36. Coffey, M. J. & Ooi, C. Y. in *Acute Pancreatitis* (InTech, 2012). at ">http://www.intechopen.com/books/acute-pancreatitis/pancreatitis-in-cystic-fibrosis-and-cftr-related-disorder#SEC1>
- 37. Moskowitz, S. M. *et al.* Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **10**, 851–868 (2008).
- 38. Davis, P. B. Cystic fibrosis since 1938. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 173, 475-482 (2006).
- 39. Moran, A. *et al.* Cystic fibrosis-related diabetes: current trends in prevalence, incidence, and mortality. *Diabetes Care* **32**, 1626–1631 (2009).
- 40. Haute Autorité de Santé. Mucoviscidose Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare. (2006).
- 41. Noone, P. G. & Knowles, M. R. 'CFTR-opathies': disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations. *Respir. Res.* **2**, 328–332 (2001).
- 42. Bombieri, C. *et al.* Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **10 Suppl 2,** S86–102 (2011).
- 43. Système respiratoire humain. at <http://tecfaetu.unige.ch/staf/stafg/sierra/staf15/hypertexte1/respiration.html>
- 44. Rackley, C. R. & Stripp, B. R. Building and maintaining the epithelium of the lung. *J. Clin. Invest.* **122**, 2724–2730 (2012).
- 45. Rock, J. R., Randell, S. H. & Hogan, B. L. M. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis. Model. Mech.* **3**, 545–556 (2010).
- 46. Knight, D. A. & Holgate, S. T. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirol. Carlton Vic* **8**, 432–446 (2003).

- 47. Soleas, J. P., Paz, A., Marcus, P., McGuigan, A. & Waddell, T. K. Engineering airway epithelium. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 982971 (2012).
- 48. Thornton, D. J., Rousseau, K. & McGuckin, M. A. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu. Rev. Physiol.* **70**, 459–486 (2008).
- 49. Voynow, J. A. & Rubin, B. K. Mucins, mucus, and sputum. *Chest* **135**, 505–512 (2009).
- 50. Hollenhorst, M. I., Richter, K. & Fronius, M. Ion transport by pulmonary epithelia. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 174306 (2011).
- 51. Toczyłowska-Mamińska, R. & Dołowy, K. Ion transporting proteins of human bronchial epithelium. *J. Cell. Biochem.* **113**, 426–432 (2012).
- 52. Cant, N., Pollock, N. & Ford, R. C. CFTR structure and cystic fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **52**, 15–25 (2014).
- 53. Li, C. & Naren, A. P. Analysis of CFTR interactome in the macromolecular complexes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **741**, 255–270 (2011).
- 54. Linsdell, P. Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Exp. Physiol.* **91**, 123–129 (2006).
- 55. Bompadre, S., Sohma, Y., Li, M. & Hwang, T. G551D and G1349D, Two CF-associated Mutations in the Signature Sequences of CFTR, Exhibit Distinct Gating Defects. *J. Gen. Physiol.* **129**, 285–298 (2007).
- 56. Kreda, S. M. *et al.* Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia. *Mol. Biol. Cell* **16**, 2154–2167 (2005).
- 57. Poulsen, J. H., Fischer, H., Illek, B. & Machen, T. E. Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5340–5344 (1994).
- 58. Lorentzen, D. *et al.* Concentration of the antibacterial precursor thiocyanate in cystic fibrosis airway secretions. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 1144–1150 (2011).
- 59. Linsdell, P. & Hanrahan, J. W. Glutathione permeability of CFTR. Am. J. Physiol. 275, C323–326 (1998).
- 60. Gao, L., Kim, K. J., Yankaskas, J. R. & Forman, H. J. Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *Am. J. Physiol.* **277**, L113–118 (1999).
- 61. Gadsby, D. C., Vergani, P. & Csanády, L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* **440**, 477–483 (2006).
- 62. Vankeerberghen, A., Cuppens, H. & Cassiman, J.-J. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **1**, 13–29 (2002).
- 63. Akabas, M. H. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J. Biol. Chem.* **275**, 3729–3732 (2000).
- 64. Edelman, A. & Saussereau, E. [Cystic fibrosis and other channelopathies]. Arch. Pédiatrie Organe Off. Sociéte Fr. Pédiatrie **19 Suppl 1,** S13–16 (2012).
- 65. Gabriel, S. E., Clarke, L. L., Boucher, R. C. & Stutts, M. J. CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* **363**, 263–268 (1993).
- 66. Schwiebert, E. M. *et al.* CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* **81**, 1063–1073 (1995).
- 67. Stutts, M. J. *et al.* CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* **269**, 847–850 (1995).

- 68. Ismailov, I. I. *et al.* Regulation of epithelial sodium channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **271**, 4725–4732 (1996).
- 69. Reddy, M. M., Light, M. J. & Quinton, P. M. Activation of the epithelial Na+ channel (ENaC) requires CFTR Cl- channel function. *Nature* **402**, 301–304 (1999).
- McNicholas, C. M. *et al.* Sensitivity of a renal K+ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8083–8088 (1996).
- 71. Ahn, W. *et al.* Regulatory interaction between the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and HCO3- salvage mechanisms in model systems and the mouse pancreatic duct. *J. Biol. Chem.* **276**, 17236–17243 (2001).
- Lee, M. G. *et al.* Regulation of Cl-/ HCO3- exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 cells. *J. Biol. Chem.* 274, 3414– 3421 (1999).
- 73. Garnett, J. P., Hickman, E., Tunkamnerdthai, O., Cuthbert, A. W. & Gray, M. A. Protein phosphatase 1 coordinates CFTR-dependent airway epithelial HCO3- secretion by reciprocal regulation of apical and basolateral membrane Cl(-)-HCO3- exchangers. *Br. J. Pharmacol.* **168**, 1946–1960 (2013).
- 74. Losa, D., Chanson, M. & Crespin, S. Connexins as therapeutic targets in lung disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **15**, 989–1002 (2011).
- 75. Chanson, M., Kotsias, B. A., Peracchia, C. & O'Grady, S. M. Interactions of connexins with other membrane channels and transporters. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **94,** 233–244 (2007).
- 76. Chanson, M. *et al.* Regulation of gap junctional communication by a pro-inflammatory cytokine in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-expressing but not cystic fibrosis airway cells. *Am. J. Pathol.* **158**, 1775–1784 (2001).
- Huang, S. *et al.* Src signaling links mediators of inflammation to Cx43 gap junction channels in primary and transformed CFTR-expressing airway cells. *Cell Commun. Adhes.* 10, 279–285 (2003).
- 78. Barbe, M. T., Monyer, H. & Bruzzone, R. Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiol. Bethesda Md* **21**, 103–114 (2006).
- 79. Praetorius, H. A. & Leipziger, J. ATP release from non-excitable cells. *Purinergic Signal.* **5**, 433–446 (2009).
- Schreiber, R., Nitschke, R., Greger, R. & Kunzelmann, K. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 274, 11811–11816 (1999).
- 81. Fahy, J. V. & Dickey, B. F. Airway mucus function and dysfunction. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2233–2247 (2010).
- 82. Berkebile, A. R. & McCray, P. B. Effects of airway surface liquid pH on host defense in cystic fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **52**, 124–129 (2014).
- 83. Tang, A. C. *et al.* Current concepts: host-pathogen interactions in cystic fibrosis airways disease. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* **23**, 320–332 (2014).
- 84. Mall, M., Grubb, B. R., Harkema, J. R., O'Neal, W. K. & Boucher, R. C. Increased airway epithelial Na+ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat. Med.* **10**, 487–493 (2004).
- 85. Itani, O. A. *et al.* Human cystic fibrosis airway epithelia have reduced Cl- conductance but not increased Na+ conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10260–10265 (2011).

- 86. Chen, J.-H. *et al.* Loss of anion transport without increased sodium absorption characterizes newborn porcine cystic fibrosis airway epithelia. *Cell* **143**, 911–923 (2010).
- 87. Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R. & Huffnagle, G. B. The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert Rev. Respir. Med.* **7**, 245–257 (2013).
- 88. Brennan, S. Innate immune activation and cystic fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* **9**, 271–279; quiz 279–280 (2008).
- 89. McIsaac, S. M., Stadnyk, A. W. & Lin, T.-J. Toll-like receptors in the host defense against Pseudomonas aeruginosa respiratory infection and cystic fibrosis. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 977–985 (2012).
- Gaspar, M. C., Couet, W., Olivier, J.-C., Pais, A. a. C. C. & Sousa, J. J. S. Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: a review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **32**, 1231– 1252 (2013).
- 91. Callaghan, M. & McClean, S. Bacterial host interactions in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 71–77 (2012).
- 92. Lovewell, R. R., Patankar, Y. R. & Berwin, B. Mechanisms of phagocytosis and host clearance of Pseudomonas aeruginosa. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **306**, L591–603 (2014).
- 93. Cohen, T. S. & Prince, A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat. Med.* **18**, 509–519 (2012).
- 94. Blohmke, C. J. *et al.* TLR5 as an anti-inflammatory target and modifier gene in cystic fibrosis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **185**, 7731–7738 (2010).
- 95. Dhooghe, B., Noël, S., Huaux, F. & Leal, T. Lung inflammation in cystic fibrosis: pathogenesis and novel therapies. *Clin. Biochem.* **47**, 539–546 (2014).
- 96. Tabary, O. *et al.* Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro. *Am. J. Pathol.* **153**, 921–930 (1998).
- 97. Perez, A. *et al.* CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **292**, L383–395 (2007).
- 98. Vij, N., Mazur, S. & Zeitlin, P. L. CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. *PloS One* **4**, e4664 (2009).
- 99. Hunter, M. J. *et al.* Expression of wild-type CFTR suppresses NF-kappaB-driven inflammatory signalling. *PloS One* **5**, e11598 (2010).
- 100. Balough, K. *et al.* The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **20**, 63–70 (1995).
- 101. Khan, T. Z. *et al.* Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151,** 1075–1082 (1995).
- 102. Tirouvanziam, R. *et al.* Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**, 121–127 (2000).
- Verhaeghe, C., Delbecque, K., de Leval, L., Oury, C. & Bours, V. Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 6, 304– 308 (2007).
- 104. Eidelman, O. *et al.* Control of the proinflammatory state in cystic fibrosis lung epithelial cells by genes from the TNF-alphaR/NFkappaB pathway. *Mol. Med. Camb. Mass* **7**, 523–534 (2001).
- 105. Tabary, O. *et al.* Relationship between IkappaBalpha deficiency, NFkappaB activity and interleukin-8 production in CF human airway epithelial cells. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* **443 Suppl 1,** S40–44 (2001).

- 106. Weber, A. J., Soong, G., Bryan, R., Saba, S. & Prince, A. Activation of NF-kappaB in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl- channel function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **281**, L71–78 (2001).
- 107. Jacquot, J., Tabary, O., Le Rouzic, P. & Clement, A. Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1703–1715 (2008).
- 108. Rottner, M., Freyssinet, J.-M. & Martínez, M. C. Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. *Respir. Res.* **10**, 23 (2009).
- 109. Painter, R. G. *et al.* CFTR Expression in human neutrophils and the phagolysosomal chlorination defect in cystic fibrosis. *Biochemistry (Mosc.)* **45**, 10260–10269 (2006).
- 110. Painter, R. G. *et al.* The role of chloride anion and CFTR in killing of Pseudomonas aeruginosa by normal and CF neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 1345–1353 (2008).
- 111. Di, A. *et al.* CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat. Cell Biol.* **8**, 933–944 (2006).
- 112. Kingma, P. CFTR and Neutrophil function: our children may have the answers. in (2010).
- 113. Haggie, P. M. & Verkman, A. S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-independent phagosomal acidification in macrophages. *J. Biol. Chem.* **282**, 31422–31428 (2007).
- 114. Crosby, L. M. & Waters, C. M. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **298**, L715–731 (2010).
- 115. Adam, D. *et al.* [Regeneration of airway epithelium]. *Rev. Mal. Respir.* **31**, 300–311 (2014).
- 116. Chen, P. & Parks, W. C. Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration. *J. Cell. Biochem.* **108**, 1233–1243 (2009).
- 117. Dunsmore, S. E. *et al.* Matrilysin expression and function in airway epithelium. *J. Clin. Invest.* **102**, 1321–1331 (1998).
- 118. Regamey, N., Jeffery, P. K., Alton, E. W. F. W., Bush, A. & Davies, J. C. Airway remodelling and its relationship to inflammation in cystic fibrosis. *Thorax* **66**, 624–629 (2011).
- 119. Hajj, R. *et al.* Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J. Pathol.* **211**, 340–350 (2007).
- 120. Schiller, K. R., Maniak, P. J. & O'Grady, S. M. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **299**, C912–921 (2010).
- 121. Trinh, N. T. N. *et al.* Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. *Eur. Respir. J.* **40**, 1390–1400 (2012).
- 122. Kirk, K. L. CFTR channels and wound healing. Focus on 'Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair'. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **299**, C888–890 (2010).
- 123. Amin, R. & Ratjen, F. Emerging drugs for cystic fibrosis. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **19**, 143–155 (2014).
- 124. Mall, M. A. & Hartl, D. CFTR: cystic fibrosis and beyond. *Eur. Respir. J.* (2014). doi:10.1183/09031936.00228013
- Bell, S. C., De Boeck, K. & Amaral, M. D. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls. *Pharmacol. Ther.* (2014). doi:10.1016/j.pharmthera.2014.06.005

- 126. Davies, J. C., Ebdon, A.-M. & Orchard, C. Recent advances in the management of cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* (2014). doi:10.1136/archdischild-2013-304400
- 127. Armstrong, D. K., Cunningham, S., Davies, J. C. & Alton, E. W. F. W. Gene therapy in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* **99**, 465–468 (2014).
- 128. Gruenert, D. C., Willems, M., Cassiman, J. J. & Frizzell, R. A. Established cell lines used in cystic fibrosis research. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **3 Suppl 2**, 191–196 (2004).
- 129. Fulcher, M. L. *et al.* Novel human bronchial epithelial cell lines for cystic fibrosis research. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **296**, L82–91 (2009).
- 130. Fogh, J., Fogh, J. M. & Orfeo, T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**, 221–226 (1977).
- 131. Finkbeiner, W. E., Zlock, L. T., Mehdi, I. & Widdicombe, J. H. Cultures of human tracheal gland cells of mucous or serous phenotype. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **46**, 450–456 (2010).
- 132. Shan, J., Huang, J., Liao, J., Robert, R. & Hanrahan, J. W. Anion secretion by a model epithelium: more lessons from Calu-3. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* **202**, 523–531 (2011).
- 133. Shen, B. Q., Finkbeiner, W. E., Wine, J. J., Mrsny, R. J. & Widdicombe, J. H. Calu-3: a human airway epithelial cell line that shows cAMP-dependent Cl- secretion. *Am. J. Physiol.* **266**, L493–501 (1994).
- 134. Florea, B. I., Cassara, M. L., Junginger, H. E. & Borchard, G. Drug transport and metabolism characteristics of the human airway epithelial cell line Calu-3. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **87**, 131–138 (2003).
- 135. Ong, H. X., Traini, D. & Young, P. M. Pharmaceutical applications of the Calu-3 lung epithelia cell line. *Expert Opin. Drug Deliv.* **10**, 1287–1302 (2013).
- 136. Pezzulo, A. A. *et al.* The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **300**, L25–31 (2011).
- 137. Grainger, C. I., Greenwell, L. L., Lockley, D. J., Martin, G. P. & Forbes, B. Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharm. Res.* **23**, 1482–1490 (2006).
- 138. Harrington, H. *et al.* Immunocompetent 3D model of human upper airway for disease modeling and in vitro drug evaluation. *Mol. Pharm.* **11**, 2082–2091 (2014).
- 139. ATCC. Calu-3 ATCC [®] HTB-55[™]. at <http://www.lgcstandardsatcc.org/Products/All/HTB-55.aspx#generalinformation>
- 140. Gruenert, D. C. *et al.* Characterization of human tracheal epithelial cells transformed by an origin-defective simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85,** 5951–5955 (1988).
- 141. Scholte, B. J. *et al.* Immortalization of nasal polyp epithelial cells from cystic fibrosis patients. *Exp. Cell Res.* **182**, 559–571 (1989).
- 142. Jefferson, D. M. *et al.* Expression of normal and cystic fibrosis phenotypes by continuous airway epithelial cell lines. *Am. J. Physiol.* **259**, L496–505 (1990).
- 143. Zeitlin, P. L. *et al.* A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: immortalization by adeno-12-SV40 infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **4**, 313–319 (1991).
- 144. Egan, M. *et al.* Defective regulation of outwardly rectifying Cl- channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature* **358**, 581–584 (1992).

- 145. Olsen, J. C. *et al.* Correction of the apical membrane chloride permeability defect in polarized cystic fibrosis airway epithelia following retroviral-mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther.* **3**, 253–266 (1992).
- 146. Cozens, A. L. *et al.* CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **10**, 38–47 (1994).
- 147. Meng, Q. H. *et al.* Lack of inducible nitric oxide synthase in bronchial epithelium: a possible mechanism of susceptibility to infection in cystic fibrosis. *J. Pathol.* **184,** 323–331 (1998).
- 148. Ehrhardt, C. *et al.* Towards an in vitro model of cystic fibrosis small airway epithelium: characterisation of the human bronchial epithelial cell line CFBE41o-. *Cell Tissue Res.* **323**, 405–415 (2006).
- 149. Kunzelmann, K. *et al.* Epithelial cell specific properties and genetic complementation in a delta F508 cystic fibrosis nasal polyp cell line. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **31,** 617–624 (1995).
- 150. Cozens, A. L. *et al.* Characterization of immortal cystic fibrosis tracheobronchial gland epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5171–5175 (1992).
- 151. Cozens, A. L. *et al.* Chloride ion transport in transformed normal and cystic fibrosis epithelial cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **290,** 187–194; discussion 194–196 (1991).
- 152. Merten, M. D. *et al.* A transformed human tracheal gland cell line, MM-39, that retains serous secretory functions. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **15**, 520–528 (1996).
- 153. Kammouni, W. *et al.* A cystic fibrosis tracheal gland cell line, CF-KM4. Correction by adenovirus-mediated CFTR gene transfer. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**, 684–691 (1999).
- 154. Lemnaouar, M. *et al.* Oncogene-mediated propagation of tracheal epithelial cells from two cystic fibrosis fetuses with different mutations. Characterization of CFT-1 and CFT-2 cells in culture. *Eur. J. Clin. Invest.* **23**, 151–160 (1993).
- 155. Hidalgo, I. J., Raub, T. J. & Borchardt, R. T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **96**, 736–749 (1989).
- 156. ATCC. T84 ATCC [®] CCL-248[™]. at <http://www.lgcstandardsatcc.org/products/all/CCL-248.aspx?geo_country=fr#generalinformation>
- 157. Augeron, C. & Laboisse, C. L. Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.* **44**, 3961–3969 (1984).
- 158. Schoumacher, R. A. *et al.* A cystic fibrosis pancreatic adenocarcinoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87,** 4012–4016 (1990).
- 159. Drumm, M. L. *et al.* Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirusmediated gene transfer. *Cell* **62**, 1227–1233 (1990).
- 160. Chastre, E. *et al.* Functional insertion of the SV40 large T oncogene in cystic fibrosis intestinal epithelium. Characterization of CFI-3 cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 21239–21246 (1991).
- 161. Anderson, M. P., Rich, D. P., Gregory, R. J., Smith, A. E. & Welsh, M. J. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* **251**, 679–682 (1991).
- 162. Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R. L. & Isselbacher, K. J. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J. Cell Biol.* **80**, 248–265 (1979).

- 163. Bijman, J. *et al.* Low-conductance chloride channels in IEC-6 and CF nasal cells expressing CFTR. *Am. J. Physiol.* **264**, L229–235 (1993).
- 164. Sheppard, D. N., Carson, M. R., Ostedgaard, L. S., Denning, G. M. & Welsh, M. J. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in a model epithelium. *Am. J. Physiol.* **266**, L405–413 (1994).
- 165. Rommens, J. M. *et al.* cAMP-inducible chloride conductance in mouse fibroblast lines stably expressing the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 7500–7504 (1991).
- 166. Dechecchi, M. C., Tamanini, A., Berton, G. & Cabrini, G. Protein kinase C activates chloride conductance in C127 cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *J. Biol. Chem.* **268**, 11321–11325 (1993).
- 167. Takacs-Jarrett, M., Sweeney, W. E., Avner, E. D. & Cotton, C. U. Generation and phenotype of cell lines derived from CF and non-CF mice that carry the H-2K(b)-tsA58 transgene. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, C228–236 (2001).
- 168. Tabcharani, J. A., Chang, X. B., Riordan, J. R. & Hanrahan, J. W. Phosphorylationregulated Cl- channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* **352**, 628–631 (1991).
- 169. Mendes, F. *et al.* Establishment and characterization of a novel polarized MDCK epithelial cellular model for CFTR studies. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **16**, 281–290 (2005).
- 170. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).
- 171. Pickering, S. J. *et al.* Generation of a human embryonic stem cell line encoding the cystic fibrosis mutation deltaF508, using preimplantation genetic diagnosis. *Reprod. Biomed. Online* **10**, 390–397 (2005).
- 172. Mateizel, I. *et al.* Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **21**, 503–511 (2006).
- 173. Deleu, S. *et al.* Human cystic fibrosis embryonic stem cell lines derived on placental mesenchymal stromal cells. *Reprod. Biomed. Online* **18**, 704–716 (2009).
- 174. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
- 175. Mou, H. *et al.* Generation of multipotent lung and airway progenitors from mouse ESCs and patient-specific cystic fibrosis iPSCs. *Cell Stem Cell* **10**, 385–397 (2012).
- 176. Wong, A. P. *et al.* Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein. *Nat. Biotechnol.* **30**, 876–882 (2012).
- 177. Wang, D., Haviland, D. L., Burns, A. R., Zsigmond, E. & Wetsel, R. A. A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4449–4454 (2007).
- 178. Wong, A. P. & Rossant, J. Generation of Lung Epithelium from Pluripotent Stem Cells. *Curr. Pathobiol. Rep.* **1**, 137–145 (2013).
- 179. Huang, S. X. L. *et al.* Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **32**, 84–91 (2014).
- 180. Firth, A. L. *et al.* Generation of multiciliated cells in functional airway epithelia from human induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E1723–1730 (2014).

- 181. Lechner, J. F., Haugen, A., McClendon, I. A. & Pettis, E. W. Clonal growth of normal adult human bronchial epithelial cells in a serum-free medium. *In Vitro* **18**, 633–642 (1982).
- 182. Widdicombe, J. H., Coleman, D. L., Finkbeiner, W. E. & Tuet, I. K. Electrical properties of monolayers cultured from cells of human tracheal mucosa. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 **58**, 1729–1735 (1985).
- 183. Wu, R., Yankaskas, J., Cheng, E., Knowles, M. R. & Boucher, R. Growth and differentiation of human nasal epithelial cells in culture. Serum-free, hormonesupplemented medium and proteoglycan synthesis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**, 311–320 (1985).
- 184. Yankaskas, J. R., Cotton, C. U., Knowles, M. R., Gatzy, J. T. & Boucher, R. C. Culture of human nasal epithelial cells on collagen matrix supports. A comparison of bioelectric properties of normal and cystic fibrosis epithelia. *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**, 1281–1287 (1985).
- 185. Boucher, R. C., Cotton, C. U., Gatzy, J. T., Knowles, M. R. & Yankaskas, J. R. Evidence for reduced Cl- and increased Na+ permeability in cystic fibrosis human primary cell cultures. *J. Physiol.* **405**, 77–103 (1988).
- 186. Steele, R. E., Preston, A. S., Johnson, J. P. & Handler, J. S. Porous-bottom dishes for culture of polarized cells. *Am. J. Physiol.* **251**, C136–139 (1986).
- 187. Whitcutt, M. J., Adler, K. B. & Wu, R. A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of cultured respiratory tract epithelial cells. *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.* **24**, 420–428 (1988).
- 188. Wu, R. *et al.* Expression of mucin synthesis and secretion in human tracheobronchial epithelial cells grown in culture. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **3**, 467–478 (1990).
- 189. Chevillard, M., Hinnrasky, J., Zahm, J. M., Plotkowski, M. C. & Puchelle, E. Proliferation, differentiation and ciliary beating of human respiratory ciliated cells in primary culture. *Cell Tissue Res.* **264**, 49–55 (1991).
- 190. Yamaya, M., Finkbeiner, W. E., Chun, S. Y. & Widdicombe, J. H. Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *Am. J. Physiol.* **262**, L713–724 (1992).
- 191. Fulcher, M. L., Gabriel, S., Burns, K. A., Yankaskas, J. R. & Randell, S. H. Welldifferentiated human airway epithelial cell cultures. *Methods Mol. Med.* **107**, 183–206 (2005).
- 192. Randell, S. H., Fulcher, M. L., O'Neal, W. & Olsen, J. C. Primary epithelial cell models for cystic fibrosis research. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **742**, 285–310 (2011).
- 193. Galietta, L. J. *et al.* An improved method to obtain highly differentiated monolayers of human bronchial epithelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **34**, 478–481 (1998).
- 194. Wiszniewski, L. *et al.* Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**, 39–48 (2006).
- 195. Banerjee, B. *et al.* Successful establishment of primary small airway cell cultures in human lung transplantation. *Respir. Res.* **10**, 99 (2009).
- 196. Shiffman, M. L., Gillon, M. J. & Galey, W. R. Pancreatic function in the reserpinized rabbit--a model for cystic fibrosis. I. Effect of secretin. *Pediatr. Res.* **16**, 104–108 (1982).
- 197. Martinez, J. R., Bylund, D. B., Mawhinney, T., Camden, J. & Ray, G. The chronically reserpinized rat as a model for cystic fibrosis: alterations in the mucus-secreting sublingual gland. *Pediatr. Res.* **17**, 523–528 (1983).

- 198. Sagström, S., McMillan, E. B., Marijianowski, M., Mulders, H. & Roomans, G. M. Changes in rat and mouse salivary glands and pancreas after chronic treatment with diuretics: a potential animal model for cystic fibrosis. *Scanning Microsc.* **4**, 161–170; discussion 170 (1990).
- 199. Wilke, M. *et al.* Mouse models of cystic fibrosis: phenotypic analysis and research applications. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **10** Suppl **2**, S152–171 (2011).
- 200. Guilbault, C., Saeed, Z., Downey, G. P. & Radzioch, D. Cystic fibrosis mouse models. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36**, 1–7 (2007).
- 201. Snouwaert, J. N. *et al.* An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* **257**, 1083–1088 (1992).
- 202. Clarke, L. L. *et al.* Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science* **257**, 1125–1128 (1992).
- 203. Snouwaert, J. N. *et al.* A murine model of cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, S59–64 (1995).
- 204. Xu, Z. *et al.* In-frame elimination of exon 10 in Cftrtm1Unc CF mice. *Gene* **211**, 117–123 (1998).
- 205. Dorin, J. R. *et al.* Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature* **359**, 211–215 (1992).
- 206. Charizopoulou, N. *et al.* Spontaneous rescue from cystic fibrosis in a mouse model. *BMC Genet.* **7**, 18 (2006).
- 207. Colledge, W. H., Ratcliff, R., Foster, D., Williamson, R. & Evans, M. J. Cystic fibrosis mouse with intestinal obstruction. *Lancet* **340**, 680 (1992).
- 208. O'Neal, W. K. *et al.* A severe phenotype in mice with a duplication of exon 3 in the cystic fibrosis locus. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 1561–1569 (1993).
- 209. Zhou, L. *et al.* Correction of lethal intestinal defect in a mouse model of cystic fibrosis by human CFTR. *Science* **266**, 1705–1708 (1994).
- 210. Colledge, W. H. *et al.* Generation and characterization of a delta F508 cystic fibrosis mouse model. *Nat. Genet.* **10**, 445–452 (1995).
- 211. Van Doorninck, J. H. *et al.* A mouse model for the cystic fibrosis delta F508 mutation. *EMBO J.* **14**, 4403–4411 (1995).
- 212. French, P. J. *et al.* A delta F508 mutation in mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator results in a temperature-sensitive processing defect in vivo. *J. Clin. Invest.* **98**, 1304–1312 (1996).
- 213. Zeiher, B. G. *et al.* A mouse model for the delta F508 allele of cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* **96**, 2051–2064 (1995).
- 214. Hasty, P. *et al.* Severe phenotype in mice with termination mutation in exon 2 of cystic fibrosis gene. *Somat. Cell Mol. Genet.* **21**, 177–187 (1995).
- 215. Delaney, S. J. *et al.* Cystic fibrosis mice carrying the missense mutation G551D replicate human genotype-phenotype correlations. *EMBO J.* **15**, 955–963 (1996).
- McMorran, B. J. *et al.* G551D CF mice display an abnormal host response and have impaired clearance of Pseudomonas lung disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281, L740–747 (2001).
- Rozmahel, R. *et al.* Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nat. Genet.* 12, 280–287 (1996).
- 218. Kent, G. *et al.* Lung disease in mice with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* **100**, 3060–3069 (1997).

- 219. Durie, P. R., Kent, G., Phillips, M. J. & Ackerley, C. A. Characteristic multiorgan pathology of cystic fibrosis in a long-living cystic fibrosis transmembrane regulator knockout murine model. *Am. J. Pathol.* **164**, 1481–1493 (2004).
- 220. Dickinson, P. *et al.* The severe G480C cystic fibrosis mutation, when replicated in the mouse, demonstrates mistrafficking, normal survival and organ-specific bioelectrics. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 243–251 (2002).
- 221. Zhou, Z. *et al.* The ENaC-overexpressing mouse as a model of cystic fibrosis lung disease. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **10 Suppl 2**, S172–182 (2011).
- 222. Tuggle, K. L. *et al.* Characterization of defects in ion transport and tissue development in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-knockout rats. *PloS One* **9**, e91253 (2014).
- 223. Stotland, P. K., Radzioch, D. & Stevenson, M. M. Mouse models of chronic lung infection with Pseudomonas aeruginosa: models for the study of cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **30**, 413–424 (2000).
- 224. Hoffmann, N. *et al.* Novel mouse model of chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection mimicking cystic fibrosis. *Infect. Immun.* **73**, 2504–2514 (2005).
- 225. Harris, A. Towards an ovine model of cystic fibrosis. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 2191–2194 (1997).
- 226. Rogers, C. S. *et al.* The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **295,** L240–263 (2008).
- 227. Rogers, C. S. *et al.* Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. *J. Clin. Invest.* **118**, 1571–1577 (2008).
- 228. Rogers, C. S. *et al.* Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* **321**, 1837–1841 (2008).
- 229. Meyerholz, D. K., Stoltz, D. A., Pezzulo, A. A. & Welsh, M. J. Pathology of gastrointestinal organs in a porcine model of cystic fibrosis. *Am. J. Pathol.* **176**, 1377–1389 (2010).
- 230. Stoltz, D. A. *et al.* Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Sci. Transl. Med.* **2**, 29ra31 (2010).
- 231. Ostedgaard, L. S. *et al.* The ΔF508 mutation causes CFTR misprocessing and cystic fibrosis-like disease in pigs. *Sci. Transl. Med.* **3**, 74ra24 (2011).
- 232. Klymiuk, N. *et al.* Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **90**, 597–608 (2012).
- 233. Stoltz, D. A. *et al.* Intestinal CFTR expression alleviates meconium ileus in cystic fibrosis pigs. *J. Clin. Invest.* **123**, 2685–2693 (2013).
- 234. Li, Z. & Engelhardt, J. F. Progress toward generating a ferret model of cystic fibrosis by somatic cell nuclear transfer. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* **1**, 83 (2003).
- 235. Sun, X. *et al.* Adeno-associated virus-targeted disruption of the CFTR gene in cloned ferrets. *J. Clin. Invest.* **118**, 1578–1583 (2008).
- 236. Sun, X. *et al.* Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* **120**, 3149–3160 (2010).
- 237. Olivier, A. K. *et al.* Abnormal endocrine pancreas function at birth in cystic fibrosis ferrets. *J. Clin. Invest.* **122**, 3755–3768 (2012).
- 238. Sun, X. *et al.* Gastrointestinal pathology in juvenile and adult CFTR-knockout ferrets. *Am. J. Pathol.* **184,** 1309–1322 (2014).

- 239. Sun, X. *et al.* Lung phenotype of juvenile and adult cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-knockout ferrets. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **50**, 502–512 (2014).
- 240. Crick, F. H. On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **12**, 138–163 (1958).
- 241. Jorgensen, R. Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol.* **8**, 340–344 (1990).
- 242. Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. & Sänger, H. L. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76**, 567–576 (1994).
- 243. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
- 244. Elbashir, S. M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494–498 (2001).
- 245. Wilson, R. C. & Doudna, J. A. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 217–239 (2013).
- 246. Castel, S. E. & Martienssen, R. A. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 100–112 (2013).
- 247. Gottumukkala, S. N. V. S., Dwarakanath, C. D. & Sudarsan, S. Ribonucleic acid interference induced gene knockdown. *J. Indian Soc. Periodontol.* **17**, 417–422 (2013).
- 248. Valinezhad Orang, A., Safaralizadeh, R. & Kazemzadeh-Bavili, M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int. J. Genomics* **2014**, 970607 (2014).
- 249. Fellmann, C. & Lowe, S. W. Stable RNA interference rules for silencing. *Nat. Cell Biol.* **16**, 10–18 (2014).
- 250. Jiao, A. L. & Slack, F. J. RNA-mediated gene activation. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* **9**, 27–36 (2014).
- 251. Azimzadeh Jamalkandi, S., Azadian, E. & Masoudi-Nejad, A. Human RNAi pathway: crosstalk with organelles and cells. *Funct. Integr. Genomics* **14**, 31–46 (2014).
- 252. Dogini, D. B. et al. The new world of RNAs. Genet. Mol. Biol. **37**, 285–293 (2014).
- 253. Deng, Y. *et al.* Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies. *Gene* **538**, 217–227 (2014).
- 254. miRBase. at <http://www.mirbase.org/>
- 255. Yanaihara, N. *et al.* Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* **9**, 189–198 (2006).
- 256. Kincaid, R. P. & Sullivan, C. S. Virus-encoded microRNAs: an overview and a look to the future. *PLoS Pathog.* **8**, e1003018 (2012).
- 257. Kulkarni, M., Ozgur, S. & Stoecklin, G. On track with P-bodies. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 242–251 (2010).
- 258. Rouet, P., Smih, F. & Jasin, M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8096–8106 (1994).
- 259. Wijshake, T., Baker, D. J. & van de Sluis, B. Endonucleases: new tools to edit the mouse genome. *Biochim. Biophys. Acta* (2014). doi:10.1016/j.bbadis.2014.04.020
- 260. Gaj, T., Gersbach, C. A. & Barbas, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* **31**, 397–405 (2013).
- 261. Kim, H. & Kim, J.-S. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 321–334 (2014).

- 262. Zhang, M. *et al.* TALE: a tale of genome editing. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **114**, 25–32 (2014).
- 263. Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S. & Gregory, P. D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 636–646 (2010).
- 264. Campbell, J. M., Hartjes, K. A., Nelson, T. J., Xu, X. & Ekker, S. C. New and TALENted genome engineering toolbox. *Circ. Res.* **113**, 571–587 (2013).
- 265. Galetto, R., Duchateau, P. & Pâques, F. Targeted approaches for gene therapy and the emergence of engineered meganucleases. *Expert Opin. Biol. Ther.* **9**, 1289–1303 (2009).
- 266. Arnould, S. *et al.* The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* **24,** 27–31 (2011).
- 267. Hafez, M. & Hausner, G. Homing endonucleases: DNA scissors on a mission. *Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can.* **55**, 553–569 (2012).
- 268. Humbert, O., Davis, L. & Maizels, N. Targeted gene therapies: tools, applications, optimization. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **47**, 264–281 (2012).
- 269. Kim, Y. G., Cha, J. & Chandrasegaran, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1156–1160 (1996).
- 270. Li, L., Wu, L. P. & Chandrasegaran, S. Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4275–4279 (1992).
- 271. Carroll, D. Zinc-finger nucleases: a panoramic view. *Curr. Gene Ther.* **11**, 2–10 (2011).
- 272. Bitinaite, J., Wah, D. A., Aggarwal, A. K. & Schildkraut, I. Fokl dimerization is required for DNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10570–10575 (1998).
- 273. Christian, M. *et al.* Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757–761 (2010).
- 274. Boch, J. *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**, 1509–1512 (2009).
- 275. Moscou, M. J. & Bogdanove, A. J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* **326**, 1501 (2009).
- 276. Mussolino, C. & Cathomen, T. TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 644–650 (2012).
- 277. Liu, L. & Fan, X.-D. CRISPR-Cas system: a powerful tool for genome engineering. *Plant Mol. Biol.* **85**, 209–218 (2014).
- 278. Kabadi, A. M. & Gersbach, C. A. Engineering synthetic TALE and CRISPR/Cas9 transcription factors for regulating gene expression. *Methods San Diego Calif* (2014). doi:10.1016/j.ymeth.2014.06.014
- 279. Hsu, P. D., Lander, E. S. & Zhang, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* **157**, 1262–1278 (2014).
- 280. Harrison, M. M., Jenkins, B. V., O'Connor-Giles, K. M. & Wildonger, J. A CRISPR view of development. *Genes Dev.* **28**, 1859–1872 (2014).
- 281. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 5429–5433 (1987).
- 282. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821 (2012).
- 283. G.Church Lab. at <http://arep.med.harvard.edu/gmc/B2.html>

- 284. Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–823 (2013).
- 285. Mali, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823–826 (2013).
- 286. Liu, C. *et al.* A fine-scale dissection of the DNA double-strand break repair machinery and its implications for breast cancer therapy. *Nucleic Acids Res.* **42**, 6106–6127 (2014).
- 287. Davis, A. J. & Chen, D. J. DNA double strand break repair via non-homologous endjoining. *Transl. Cancer Res.* **2**, 130–143 (2013).
- 288. Goodarzi, A. A. & Jeggo, P. A. The repair and signaling responses to DNA doublestrand breaks. *Adv. Genet.* **82**, 1–45 (2013).
- 289. Carroll, D. Genome engineering with targetable nucleases. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 409–439 (2014).
- 290. Povirk, L. F. Processing of damaged DNA ends for double-strand break repair in mammalian cells. *ISRN Mol. Biol.* **2012**, (2012).
- 291. Trapani, I., Puppo, A. & Auricchio, A. Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies. *Prog. Retin. Eye Res.* (2014). doi:10.1016/j.preteyeres.2014.08.001
- 292. Yin, H. *et al.* Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 541–555 (2014).
- 293. Ibraheem, D., Elaissari, A. & Fessi, H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int. J. Pharm.* **459**, 70–83 (2014).
- 294. Mali, S. Delivery systems for gene therapy. *Indian J. Hum. Genet.* **19**, 3–8 (2013).
- 295. Kotterman, M. A. & Schaffer, D. V. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 445–451 (2014).
- 296. Sakuma, T., Barry, M. A. & Ikeda, Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem. J.* **443**, 603–618 (2012).
- 297. Naldini, L. *et al.* In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263–267 (1996).
- 298. Box, G. E. P. & Draper, N. R. *Empirical Model-building and Response Surface*. (John Wiley & amp; Sons, Inc., 1986).
- 299. Ramachandran, S. *et al.* Efficient delivery of RNA interference oligonucleotides to polarized airway epithelia in vitro. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **305**, L23–32 (2013).
- 300. Palmer, M. L. *et al.* Protease-activated receptor regulation of Cl- secretion in Calu-3 cells requires prostaglandin release and CFTR activation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **290**, C1189–1198 (2006).
- 301. Bantounas, I., Phylactou, L. A. & Uney, J. B. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *J. Mol. Endocrinol.* **33**, 545–557 (2004).
- 302. Gama Sosa, M. A., De Gasperi, R. & Elder, G. A. Animal transgenesis: an overview. *Brain Struct. Funct.* **214**, 91–109 (2010).
- 303. Kaur, I. P., Chopra, K., Rishi, P., Puri, S. & Sharma, G. Small RNAs: the qualified candidates for gene manipulation in diverse clinical pathologies. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **31**, 305–329 (2014).
- Martínez, T., Wright, N., López-Fraga, M., Jiménez, A. I. & Pañeda, C. Silencing human genetic diseases with oligonucleotide-based therapies. *Hum. Genet.* 132, 481– 493 (2013).

- 305. Zhou, Y., Zhang, C. & Liang, W. Development of RNAi technology for targeted therapy A track of siRNA based agents to RNAi therapeutics. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* (2014). doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.044
- 306. MacVinish, L. J., Cope, G., Ropenga, A. & Cuthbert, A. W. Chloride transporting capability of Calu-3 epithelia following persistent knockdown of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR. *Br. J. Pharmacol.* **150**, 1055–1065 (2007).
- 307. Crespin, S. *et al.* Cx26 regulates proliferation of repairing basal airway epithelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **52**, 152–160 (2014).
- 308. An, D. S. *et al.* Optimization and functional effects of stable short hairpin RNA expression in primary human lymphocytes via lentiviral vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **14**, 494–504 (2006).
- 309. Martin, J. N. *et al.* Lethal toxicity caused by expression of shRNA in the mouse striatum: implications for therapeutic design. *Gene Ther.* **18**, 666–673 (2011).
- 310. Grimm, D. The dose can make the poison: lessons learned from adverse in vivo toxicities caused by RNAi overexpression. *Silence* **2**, 8 (2011).
- 311. Anderson, J. & Akkina, R. HIV-1 resistance conferred by siRNA cosuppression of CXCR4 and CCR5 coreceptors by a bispecific lentiviral vector. *AIDS Res. Ther.* **2**, 1 (2005).
- 312. Li, M.-J. *et al.* Long-term inhibition of HIV-1 infection in primary hematopoietic cells by lentiviral vector delivery of a triple combination of anti-HIV shRNA, anti-CCR5 ribozyme, and a nucleolar-localizing TAR decoy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **12**, 900–909 (2005).
- 313. Sun, D., Melegari, M., Sridhar, S., Rogler, C. E. & Zhu, L. Multi-miRNA hairpin method that improves gene knockdown efficiency and provides linked multi-gene knockdown. *BioTechniques* **41**, 59–63 (2006).
- 314. Zhu, X. *et al.* A versatile approach to multiple gene RNA interference using microRNA-based short hairpin RNAs. *BMC Mol. Biol.* **8**, 98 (2007).
- 315. Shan, Z. X. *et al.* A quick and efficient approach for gene silencing by using triple putative microRNA-based short hairpin RNAs. *Mol. Cell. Biochem.* **323**, 81–89 (2009).
- 316. Curtin, J. A., Dane, A. P., Swanson, A., Alexander, I. E. & Ginn, S. L. Bidirectional promoter interference between two widely used internal heterologous promoters in a late-generation lentiviral construct. *Gene Ther.* **15**, 384–390 (2008).
- 317. Hsu, P. D. *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* **31**, 827–832 (2013).
- 318. Philippe, S. *et al.* Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17684–17689 (2006).
- 319. Bensman, T. J., Nguyen, A. N., Rao, A. P. & Beringer, P. M. Doxycycline exhibits antiinflammatory activity in CF bronchial epithelial cells. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **25**, 377–382 (2012).
- 320. Bae, C. H., Chen, S. M., Lee, H.-M., Song, S.-Y. & Kim, Y.-D. The Effect of Doxycycline on PMA-Induced MUC5B Expression via MMP-9 and p38 in NCI-H292 Cells. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* **4**, 177–183 (2011).
- 321. Ito, Y., Son, M., Kume, H. & Yamaki, K. Novel effects of minocycline on Ca(2+)dependent Cl(-) secretion in human airway epithelial Calu-3 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **176**, 101–109 (2001).

322. Losa, D. *et al.* Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis in airway epithelial cells is mediated by gap junctional communication in a JNK-dependent manner. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **192,** 4804–4812 (2014).
ANNEXES

Annexe 1 : Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis in airway epithelial

cells is mediated by gap junctional communication in a JNK-dependent manner

Pseudomonas aeruginosa–Induced Apoptosis in Airway Epithelial Cells Is Mediated by Gap Junctional Communication in a JNK-Dependent Manner

Davide Losa,* Thilo Köhler,^{†,‡} Jessica Bellec,[§] Tecla Dudez,* Sophie Crespin,* Marc Bacchetta,* Pierre Boulanger,[¶] Saw See Hong,[¶] Sandrine Morel,[∥] Tuan H. Nguyen,[§] Christian van Delden,^{†,‡} and Marc Chanson*

Chronic infection and inflammation of the airways is a hallmark of cystic fibrosis (CF), a disease caused by mutations in the CF transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene. The response of the CF airway epithelium to the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* is characterized by altered inflammation and apoptosis. In this study, we examined innate immune recognition and epithelial responses at the level of the gap junction protein connexin43 (Cx43) in polarized human airway epithelial cells upon infection by PAO1. We report that PAO1 activates cell surface receptors to elicit an intracellular signaling cascade leading to enhancement of gap junctional communication. Expression of Cx43 involved an opposite regulation exerted by JNK and p38 MAPKs. PAO1-induced apoptosis was increased in the presence of a JNK inhibitor, but latter effect was prevented by lentiviral expression of a Cx43-specific short hairpin RNA. Moreover, we found that JNK activity was upregulated by pharmacological inhibition of CFTR in Calu-3 cells, whereas correction of a CF airway cell line (CF₁₅ cells) by adenoviral expression of CFTR reduced the activation of this MAPK. Interestingly, CFTR inhibition in Calu-3 cells was associated with decreased Cx43 expression and reduced apoptosis. These results indicate that Cx43 expression is a component of the response of airway epithelial cells to innate immune activation by regulating the survival/apoptosis balance. Defective CFTR could alter this equilibrium with deleterious consequences on the CF epithelial response to *P. aeruginosa*. *The Journal of Immunology*, 2014, 192: 4804–4812.

s part of the innate immune system, epithelial cells represent a first line of defense against pathogens, a phenomenon critical for host survival. Epithelial cells form a tight barrier by means of expression of the junctional complex and mediate inflammatory responses by secreting eicosanoids, nucleotides, cytokines, and chemokines (1). Alterations in the integrity of the host epithelium during infection may cause life-threatening conditions. In cystic fibrosis (CF), chronic infection of the airways by *Pseudomonas aeruginosa* leads to severe

Received for publication May 15, 2013. Accepted for publication March 10, 2014.

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CF, cystic fibrosis; CFTR, CF transmembrane conductance regulator; Chel, Chelerythrin; EGFP, enhanced GFP; HAEC, human airway epithelial cell; HK, heat-killed; MOI, multiplicity of infection; PKC, protein kinase C; shRNA, short hairpin RNA; siRNA, small interfering RNA.

Copyright © 2014 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/14/\$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1301294

pulmonary damage and is responsible for mortality and morbidity in the CF population (2). CF is a genetic disease caused by mutations in the CF transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene that codes for a cAMP- and ATP-regulated chloride channel that is located in glandular and surface airway epithelial cells. Activation of CFTR contributes to the regulation of airway surface liquid height and viscosity, and thus to efficient mucociliary clearance (3). It is believed that, in CF, absence of functional CFTR impairs hydration of the mucus and impairs bacterial clearance by ciliated cells, thus providing a favorable environment for infection and colonization of the airways and lung by *P. aeruginosa*. This Gramnegative rod is considered an opportunistic pathogen in patients with compromised innate immune responses, as also observed in individuals suffering of cancer and burns (2).

P. aeruginosa secretes virulence factors and injects cytotoxins into airway epithelial cells, thereby counteracting the innate immune response activated by complex mechanisms involving host membrane receptors (4). TLRs have been shown to stimulate the production of cytokines and nucleotides by airway epithelial cells. Recognition of bacterial pilin, LPS, and flagellin by TLR2, TLR4, and TLR5 has been reported to trigger MyD88-dependent signaling cascades involving NF-KB, ERK, JNK, and p38 to control translational and posttranslational production of proinflammatory chemokines, such as IL-8 (5). Collectively, the release of cytokines and nucleotides by airway epithelial cells is needed for the recruitment of inflammatory cells to infected sites and to facilitate CFTR-dependent chloride fluxes, respectively, thereby optimizing pathogen clearance. In CF, the secretory response would be absent, but activation of inflammatory genes would persist. Indeed, IL-8, a potent chemotactic factor for neutrophils, is the most abundant chemokine detected in the airway secretions of CF patients in both early and advanced stages of the disease (6).

^{*}Laboratory of Clinical Investigation III, Geneva University Hospitals, 1211 Geneva, Switzerland; ¹Service of Infectious Diseases, Geneva University Hospitals, 1211 Geneva, Switzerland; ¹Department of Microbiology and Molecular Medicine, University of Geneva, 1211 Geneva, Switzerland; ⁵INSERM, Unité Mixte de Recherche 1064, Centre Hospitalier Universitaire Nantes, ITUN, 44093 Nantes, France; ¹Université Claude Bernard Lyon 1-Institut National de la Recherche Agronomique– Ecole Pratique des Hautes Etudes–Unité Mixte de Recherche 754, 69366 Lyon, France; and ¹Department of Pathology and Immunology, University of Geneva, 1211 Geneva, Switzerland

This work was supported by Swiss National Science Foundation Grants 310030_134907/1 (to M.C.) and 32473B_140929 (to C.v.D.). S.C. and J.B. were supported by Vaincre la Mucoviscidose. D.L. was supported by Italian Cystic Fibrosis Research Foundation Grant 19/2009 (adopted by Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica delegation La Bottega delle Donne) and by Fondation pour des Bourses d'Etudes Italo-Suisses.

Address correspondence and reprint requests to Prof. Marc Chanson, Laboratory of Clinical Investigation III, Foundation for Medical Research, 64 Avenue de la Roseraie, 1211 Geneva, Switzerland. E-mail addresses: marc.chanson@hcuge.ch and marc.chanson@unige.ch

The Journal of Immunology

The homeostasis of the epithelium is severely challenged upon infection, a process that might affect the junctional complex (1). The junctional complex consists of anchoring junctions (desmosomes and adherens junctions), occluding junctions (tight junctions), and communicating junctions (gap junctions). Gap junctions have been recently involved in bacterial infections and several infectious diseases, including CF (7). Gap junctions are made by docking of two hexameric hemichannels (connexons) of two apposed cells, thus composed of 12 proteins called connexins. Hemichannels function as transmembrane channels involved in the release to the extracellular space of nucleotides, glutathione, and PGs. Gap junctions ensure the direct cell-to-cell transfer of ions, sugars, nucleotides, short peptides, and second messengers (8). Bacterial contact, bacterial internalization, and/or bacterial cytotoxins have been found to modulate hemichannel activity and gap junctional communication in the host epithelium, resulting in imbalanced homeostasis (7, 9, 10). It was recently reported that gap junction channels favor the cell-to-cell spread of an inflammatory response dominated by IL-8 production upon Shigella flexneri internalization in an intestinal epithelial cell line (11). Less is known, however, regarding the effects of P. aeruginosa on gap junction proteins within the airway epithelium.

We have recently shown in the human airway epithelial Calu-3 cell line grown under polarized conditions that Cx43-made gap junction channels coordinate a signaling network to activate CFTR and modulate airway surface liquid volume (12). Because airway surface liquid homeostasis is a defense mechanism against infection, we sought to investigate innate immune recognition and epithelial responses at the level of Cx43 in polarized Calu-3 cells infected with PAO1, a laboratory strain of *P. aeruginosa*. We report in this study new findings showing that PAO1-triggered signaling regulates the functional expression of Cx43 in a CFTR-dependent manner. These results imply that CFTR deficiency has important consequences on this mechanism, which may contribute to the CF phenotype.

Materials and Methods

Airway cell culture

The human airway epithelial cell line Calu-3 was purchased from the American Type Culture Collection. Calu-3 cells were maintained in DMEM:F12 (3:1 v/v), supplemented with 10% FCS, 30 U/ml penicillin, and 30 mg/ml streptomycin (Life Technologies). The human nasal epithelial CF₁₅ cell line, which was derived from a patient homozygous for the F508del mutations of CFTR, was maintained in the same medium supplemented with growth factors, as previously described (13). To obtain a well-polarized cell monolayer, 100,000 Calu-3 cells or 200,000 CF₁₅ cells were seeded onto 0.33-cm² porous (0.4- μ m) Transwell polyester membranes (Transwell 3470; Corning Costar) and cultured for up to 15 d for calu-3 cells and 8 d for CF₁₅ cells. Primary human airway epithelial cells (HAECs) grown on Transwell inserts at the air–liquid interface from at least 30 d (MucilAir) were purchased from Epithelix (Epithelix Sàrl, Plan-Les-Ouates, Switzerland) and maintained, according to the manufacturer's instructions.

Airway cell infection with P. aeruginosa bacterial strains

Cells were infected with the well-characterized *P. aeruginosa* laboratory strain PAO1. PAO1*pilA* and PAO1*fliC* mutant strains lacking expression of pilin and flagellin, respectively, were used as controls. The mutated *pilA:: Tc* and and *fliC:*:Gm loci were transduced from strains PAK-NP and PAO1-RR, respectively, into our PAO1 strain, as previously described (14). Both mutants are therefore isogenic to wild-type PAO1. The PAO1 strain that we use does not display a *nfxC* phenotype and is not affected in quorum-sensing dependent virulence factor production (14). PAO1 (pIAPX2) expressing a GFP (PAO1-GFP; gift of I. Attree, CEA, Grenoble, France) was used for confocal microscopy. For cell infection, bacteria were grown overnight in Luria-Bertani medium with shaking (240 rpm) at 37°C. Bacteria were centrifuged (2 min at 6000 rpm) and resuspended in NaCI solution (0.9% NaCI supplemented with 10 mM HEPES and 1.2 mM

4805

CaCl₂) to obtain 10¹⁰ CFU/ml. Calu-3 and CF₁₅ cells were switched at the air–liquid interface prior to the challenge of apical cell membrane with 10 µl bacterial suspension (containing 2 × 10⁶ CFU) corresponding to 5 multiplicity of infection (MOI) or with 10 µl NaCl solution as a control. Heat-killed (HK)-PAOI was donated by G. Cabrini (University Hospital of Verona, Verona, Italy). In this case, 100 µl bacterial solution at the indicated concentration was added to Calu-3 cells at the apical side.

Experimental conditions

Protein kinase activity was blocked by using inhibitors for protein kinase C (PKC), Chelerythrin (Chel, 5 μ M); p38, SB203580 (SB, 10 μ M); JNK, SP600125 (SP, 10 μ M); ERK, UO126 (UO, 5 μ M); and P13K, LX294002 (LY, 10 μ M). 18 α -Glycyrrhethinic acid (α GA, 100 μ M) was used to block gap junctional communication. CFTR activity was blocked with 10 μ M GlyH-101 (GlyH). All inhibitors were applied to basal and apical compartments 30–45 min before PAO1 infections and maintained during the course of the experiments. All compounds were dissolved in DMSO, and control experiments were performed using appropriate dilutions of the solvents. All reagents were from Calbiochem, except Chel from Sigma-Aldrich. Purified flagellin from *P. aeruginosa* (InvivoGen, San Diego, CA) was used at 10 μ g/ml. TNF- α (Bachem AG, Bubendorf, Switzerland) was used at 100 U/ml.

Western blotting

Western blotting was performed using Abs against Cx43 (2 µg/ml, MAB3067; Millipore AG), CFTR (0.4 µg/ml, clone M24.1, MAB25031; R&D Systems), active Caspase-3 (0.5 µg/ml, p17 subunit, AF835; R&D Systems), phospho-JNK (p-JNK, dilution 1:1000; 4668; Cell Signaling), and total JNK (dilution 1:2000; 9258; Cell Signaling). An anti-GAPDH (0.05 µg/ml, MAB374; Millipore AG) was used as control for protein loading. Culture inserts were rinsed with PBS and scraped into an ice-cold solubilization buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mM PMSF, and a mixture of protease inhibitors [Roche]). After 30 min of incubation, the samples were centrifuged at 4°C for 10 min at 10,000 \times g. Supernatants were recovered, and total amounts of protein were determined by a bicinchoninic acid quantification assay (Pierce). Equal amount of protein was electrophoresed in SDS-PAGE and electrotransferred onto Immobilon-P polyvinylidene difluoride membranes (Millipore AG). Membranes were then blocked for 2 h in a 5% defatted milk saturation buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.6], 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20). Next, proteins were immunoblotted overnight at 4°C with appropriate Abs. This step was followed by 1-h incubation with goat antimouse or anti-rabbit IgG secondary Abs conjugated to peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Immunoreactivity was detected through the Super Signal West Pico kit (Pierce). Quantification of intensity of protein bands was performed with Image J software.

Immunohistochemistry

For immunostaining, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, rinsed with PBS, and successively treated with 0.3% Triton X-100 for 15 min, 0.5 M NH₄Cl for 15 min, and 2% BSA prepared in PBS for 30 min. Fixed cells were then incubated overnight at 4°C with 5 μ g/ml rabbit Abs against TLR5 (36-3900; Invitrogen). Cells were next incubated for 2 h at room temperature using Alexa 488-coupled goat anti-rabbit and rhodamine-phalloidin for staining actin cytoskeleton (Molecular Probes). DAPI was used for counterstaining nuclei. After rinsing, cells were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) before microscopic examination. Fluorescent cells were viewed on an inverted Zeiss LSM510 laser-scanning confocal microscope (Carl Zeiss). Images acquired through a 40× or a 63× oil immersion objective were further processed using Metafluor version 7.7.4.0 (Universal Imaging).

Annexin V staining

Apoptosis was analyzed by annexin V–enhanced GFP (EGFP) binding to phosphatidylserine at the apoptotic cell surface, according to the manufacturer's instructions (R&D Systems). Briefly, Calu-3 cells were infected for 6 or 8 h at a MOI of 5, gently washed once, and stained with annexin V-EGFP. Simultaneous staining with propidium iodide was used to identify necrosis, although it was never detected in our experiments. Images from six different fields were acquired from each culture condition through a 63× oil immersion objective by using an inverted Zeiss LSM510 laserscanning confocal microscope (Zeiss) and Metafluor software (Universal Imaging). The volume of annexin V-EGFP fluorescence and the number of DAPI-labeled nuclei were calculated from three-dimensional reconstructed images using Imaris 7.3.1 (Bitplane). Data were expressed as μm^3 /number of nuclei.

Quantitative RT-PCR

Cellular RNA was extracted from Calu-3 cells with NucleoSpin RNA II (Macheley-Nagel) at time 0, 3, and 6 h after incubation with PAO1 or control solution. For each time point, mRNAs isolated from three separate culture inserts were pooled. The reverse transcription was performed by using the Quantitect reverse-transcriptase kit (Qiagen) at 42°C for 14 min in a Biometra thermocycler (Biolabo Scientific Instruments SA, Châtel-St-Denis, Switzerland). PCR were performed on an ABI StepOne Plus detection system with TaqMan gene expression assays and TaqMan Fast master mix (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Reactions were performed in triplicate, and the relative amount of Cx43 mRNA was calculated using the comparative $\Delta\Delta$ cycle threshold method to GAPDH mRNA.

Cx43 mRNA silencing

A lentiviral vector was developed to stably express in Calu-3 cells a short hairpin RNA (shRNA) directed against Cx43. Briefly, small interfering RNA (siRNA) sequences were embedded in the following shRNA structure: 5'-sense siRNA-TCAAGAG-antisense siRNA-3'. The siRNA sequence targeting Cx43 mRNA from Invitrogen (5'-GCG CCT TAG GCA AAC TCC TTG ACA A-3') and a scramble siRNA sequence (5'-GAT AGA AAG GAT TGA CAG TGG TG-3') were used to synthesize the shRNAs shCx43 and shCTRL, respectively. The two sequences were cloned in a HIV-based lentiviral backbone (pLVTHM; provided by D. Trono, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland) downstream of the RNA polymerase III promoter H1. A GFP reporter gene expression cassette driven by the elongation factor 1\alpha promoter was also contained in the vectors. HIV-based lentiviral particles were produced using 293T cells as packaging cells. Lentiviral vector titers were determined by measuring

Cx43 AND EPITHELIAL APOPTOSIS IN RESPONSE TO P. AERUGINOSA

GFP fluorescence by FACS in HeLa cells transduced with a serial dilution of the vectors. Then, Calu-3 cells seeded on Petri dishes at low density were transduced with lentiviral vectors at a MOI of 10 in culture media containing 2 μ g/ml polybrene (Sigma-Aldrich). GFP-positive cells were FACS, and the resultant cell lines were maintained in culture for subsequent analyses and experiments.

CFTR expression with adenoviral vector

The chimeric vector HAdV5F35-GFP-CFTR has been previously described (15). HAdV5F35-GFP-CFTR encoded the wild-type allele of the *CFTR* gene fused to the 39 end of the GFP gene. Vector stocks were produced and titrated on HEK-293 cell monolayers. The HAdV5F35 vector consisted of hexon and penton base capsomers of HAdV5, and of chimeric fibers made up of the shaft and knob domains of serotype 35 fiber (F35) fused to HAdV5 fiber tail. Polarized CF₁₅ cells were apically transduced for 48 h with HAdV5F35-GFP-CFTR at a MOI of 20 in culture medium.

Dye coupling

Gap junctional intercellular communication was determined by intracellular microinjection of Lucifer Yellow (Sigma-Aldrich) in Calu-3 cells cultured on Transwell inserts for PAO1 infection experiments or on Petri dishes for verification of Cx43 gene silencing. The medium was changed to a solution containing 136 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and 2.5 mM glucose, and buffered to pH 7.4 with 10 mM HEPES-NaOH. Lucifer Yellow was prepared in 150 mM LiCl and 10 mM HEPES (pH 7.2). The tracer was injected using a thin-tip glass microelectrode into one cell for 3 min, and the number of labeled cells was counted at the end of the injection period. Fluorescent cells were viewed on an inverted TMD300 microscope (Nikon AG) equipped with a high sensitivity black and white CCD Visicam camera (Visitron Systems). Images were captured using



FIGURE 1. Cx43 expression induced by PAO1 is mediated by p38 and JNK MAPKs. Western blots (**A**, **C**, and **E**) for Cx43 (*top panels*) and GAPDH (*bottom panels*) were performed from Calu-3 cells exposed to PAO1 (MOI 5) for 6 h. (A) Cx43 expression is increased in Calu-3 cells infected for 6 h with wild-type (*wt*) and pilin-deficient (*pilA*) PAO1, but not with a flagellin-deficient (*fliC*) mutant. CTRL indicates the basal level of Cx43 expression in the absence of bacteria. (**B**) Quantitative analysis from three Western blots comparing control Calu-3 cells with Calu-3 cells exposed to PAO1 *wt, pilA*, and *fliC*, respectively. To these, we added values from two Western blots comparing control Calu-3 cells with Calu-3 cells exposed to PAO1 *wt and fliC*. Data are expressed as fold increase of the CTRL conditions. **p* < 0.05 compared with CTRL. (C) Cx43 expression is also increased in Calu-3 cells exposed to HK-PAO1 (10⁴ CFU/ml) and 10⁵ CFU/ml) for 6 h. (**D**) The expression of Cx43 mRNA was evaluated by quantitative RT-PCR as a function of time of exposure to HK-PAO1 (10⁵ CFU/ml). Data are reported as fold increase of unificetd conditions at time 0 and represent the average of two quantitative RT-PCR experiments performed in triplicate. **p* < 0.05 compared with CTRL. (**C** L (and **F**) The expression of Cx43 induced by a 6-h infection with PAO1 (MOI 5) is modulated by inhibitors of protein kinases. The PKC Chel (5 μ M), ERK UO126 (UO, 5 μ M), and P13K LY294002 (LX, 10 μ M) inhibitors had no effect on Cx43 expression. In contrast, Cx43 expression was decreased by the p38 SB203580 (SB, 10 μ M) inhibitor and increased by the INK SP600125 (SP, 10 μ M) inhibitor. *n* = 5–6, **p* < 0.05, compared with DMSO used as vehicle (Veh). Molecular mass (in kDa) markers are indicated on the *right side* of the blots.



FIGURE 2. PAO1 modulates the function of Cx43 induced via p38 and JNK MAPKs. (**A**) Gap junctional communication was evaluated by dye (Lucifer Yellow) coupling. The wild-type (*wt*, *n* = 19 dye injections) PAO1 but not the flagellin-deficient (*fliC*, *n* = 17) mutant increased the number of coupled cells. PAO1-induced dye coupling was prevented in the presence of a gap junction inhibitor (α GA, 100 μ M, *n* = 13). **p* < 0.05 compared with unstimulated control (CTRL, *n* = 9). **p* < 0.05. (**B**) The extent of dye coupling induced by PAO1 was decreased by the p38 SB203580 (SB, 10 μ M, *n* = 14) inhibitor and increased by the JNK SP600125 (SP, 10 μ M, *n* = 27) inhibitor. Vehicle (Veh):DMSO was used alone as controls for each treatment. **p* < 0.05 compared with Veh (*n* = 7 for SB; *n* = 28 for SP).

software Metafluor 4.01 (Universal Imaging) and processed using Adobe Photoshop CS2 version 9.0 (Adobe Systems).

Ussing chamber

The CFTR activity was studied by Ussing chamber technique. Transepithelial resistance averaged 317 ± 21 $\Omega \times \text{cm}^2$ (n = 5). The apical and basal chambers were filled with a Krebs-Ringer-bicarbonate buffer containing (in mM): 134 NaCl, 4 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 5 NaHCO₃, 1 glucose, and 10 HEPES (pH 7.4). The transepithelial potential difference was voltage clamped at zero, and the resulting short-circuit current (Isc) recorded continuously a VCC MC6 amplifier (Physiological Instruments). Data were sampled using the interface DI-720 (DataQ Instruments) and recorded/displayed using the Acquire & Analyze software 2.3 (Physiological Instruments). CFTR-dependent Isc was evoked by basolateral application of 10 μ M trypsin (Sigma-Aldrich), as previously reported (12).

IL-8 secretion

IL-8 secretion was measured by ELISA (Sanquin), according to the manufacturer's instructions. After 6 h of apical exposition to PAO1 or control solution, basolateral medium of polarized Calu-3 cultures was collected for analysis.

Statistical analysis

GraphPad Prism software (version 4.03) was used to compare experiments using unpaired t tests, one-way ANOVA, and the nonparametric Mann– Whitney U test, where appropriate. Values are expressed as mean \pm SEM. A p value <0.05 was considered significant.

Results

Cx43 expression is increased in Calu-3 cells after P. aeruginosa infection

Apical infection of polarized Calu-3 cells for 6 h with the P. aeruginosa wild-type strain PAO1 induced Cx43 upregulation (Fig. 1A). Increased expression of Cx43 was also observed with a PAO1 mutant strain lacking pilin (pilA) but not with a mutant strain lacking flagellin (fliC) (Fig. 1A). Quantification of the Western blots indicates that *fliC* mutant did not increase Cx43 expression above control levels (Fig. 1B). Next, we exposed polarized Calu-3 cells to HK-PAO1 to determine whether membrane components of the dead bacteria could activate airway epithelial cells. Indeed, HK-PAO1 induced Cx43 expression within hours as detected by both Western blot (Fig. 1C) and mRNA transcription (Fig. 1D). These results suggest that PAO1 induced Cx43 expression in airway epithelial cells via activation of extracellular membrane receptors. Consistent with these observations, we did not observe obvious internalization by Calu-3 cells of PAO1 expressing the GFP. Confocal microscopy revealed that PAO1-GFP accumulates at the surface of Calu-3 cells, close to areas of cell-cell contacts (Supplemental Fig. 1A). At later times of infection (>8 h), we observed disruption of junctional complexes and paracellular migration of the fluorescent bacteria toward the basal side of the airway epithelial cell monolayer (Supplemental Fig. 1A), but again no clear internalization was observed. Finally, expression on the surface of Calu-3 cells of TLR5, the receptor for flagellin, was verified by immunostaining and confocal imaging (Supplemental Fig. 1B). Although Cx43 was not overexpressed with the *fliC* mutant, infection of Calu-3 cells with this strain in the presence of purified flagellin restored Cx43 induction (Supplemental Fig. 1C, 1D).

To decipher the signaling cascade linked to PAO1-induced activation of Calu-3 cells, we tested the effects of several protein kinase inhibitors on Cx43 expression. In the absence of PAO1, we found that an inhibitor of PI3K (LY) strongly decreased basal level of Cx43 expression (Supplemental Fig. 1E, 1F). In the presence of PAO1, Cx43 induction was not affected by inhibitors of PI3K, PKC (Chel), or ERK (UO) but was inhibited by an inhibitor of p38



FIGURE 3. Cx43 function does not contribute to IL-8 release. (**A**) The inflammatory response was evaluated by the release of IL-8 6 h postinfection with wild-type (*wt*) PAO1 (MOI 5). IL-8 release was similarly induced by a PAO1 mutant lacking pilin (*pilA*) but not flagellin (*fliC*). n = 3, *p < 0.05 compared with nonstimulated control (CTRL). (**B**) Focal stimulation of Calu-3 cells was evoked by infection for 6 h with increasing MOI of PAO1, in the presence or absence of 100 µm αGA, a gap junction inhibitor. Again, no difference in IL-8 release was observed after inhibition of gap junctional communication. n = 3. (**C**) Calu-3 cells were globally stimulated with HK-PAO1 (10⁵ CFU/ml) for 6 h in the presence of 100 µm αGA. Again, gap junction blockade had no effect on IL-8 release. DMSO was used as control of the αGA treatment (vehicle [Veh]). n = 5.

Cx43 AND EPITHELIAL APOPTOSIS IN RESPONSE TO P. AERUGINOSA

MAPK (SB). Surprisingly, a JNK inhibitor (SP) enhanced Cx43 expression elicited by PAO1 (Fig. 1E, 1F).

The consequence of p38 and JNK inhibitors on the function of Cx43 was evaluated by dye coupling. Intracellular microinjection of the Cx43-permeant tracer Lucifer Yellow in well-polarized Calu-3 cells revealed that PAO1 increased gap junctional communication (Fig. 2A). As expected, the *fliC* mutant had no effect on the resting level of gap junctional communication; in contrast, the gap junction inhibitor α GA fully blocked PAO1-induced increase of dye coupling (Fig. 2A). Increased dye coupling induced by PAO1 was also prevented by p38 inhibition and enhanced by JNK inhibition (Fig. 2B). These results suggest that expression of Cx43 is tightly regulated; basal expression of Cx43 is under the control of PI3K, whereas the PAO1-stimulated expression of Cx43 is modulated by p38 and JNK.

Cx43 does not regulate IL-8 secretion

PAO1 activation of Calu-3 cells is critical to trigger NF- κ B activation and efficient IL-8 production (16). In this context, Cx43 has been reported to contribute to the propagation of proinflammatory

signals in several epithelial cell models (9–11). As shown in Fig. 3A, 6-h infection of Calu-3 cells with wild-type PAO1 or *pilA* mutants triggered strong IL-8 release. As expected, no IL-8 was produced in response to the *fliC* PAO1. We next evaluated the effects of α GA on the IL-8 response evoked by increasing MOI of PAO1. Gap junction inhibition did not affect IL-8 release (Fig. 3B). Furthermore, no effects of α GA on HK-PAO1–stimulated IL-8 secretion were observed (Fig. 3C), suggesting that gap junctional communication does not extensively contribute to the proinflammatory response of Calu-3 cells evoked by live or dead PAO1.

Cx43 contributes to airway epithelial cell apoptosis

In parallel with proinflammatory responses, *P. aeruginosa* causes apoptosis of airway epithelial cells, a mechanism that involved pathogen recognition receptors and activation of intracellular signaling pathways, including p38 and JNK (17–20). We thus studied the ability of PAO1 to induce apoptosis in Calu-3 cells by detection of active caspase-3 (p17 subunit). As shown in Fig. 4A, infection of Calu-3 cells with PAO1 activated caspase-3 within



FIGURE 4. JNK reduces apoptosis induced by PAO1. (**A**) Apoptosis was evaluated by immunoblotting-activated caspase-3 (p17-Casp3) in Calu-3 cells. PAO1 (MOI 5) increased active caspase-3 in a time-dependent manner. Inhibition of JNK with the JNK SP600125 (SP, 10 μ M) inhibitor enhanced the detection of p17-Casp3 (*top panels*). (**B**) In contrast to wild-type PAO1 (*wt*), the flagellin mutant *fliC* moderately affected p17-Casp3 detection in Calu-3 cells. Molecular mass (in kDa) markers are indicated on the *right side* of the blots. (**C**) The increase in p17-Casp3 induced by PAO1 with the JNK inhibitor (PAO1 + SP) in Calu-3 cells was reduced in the presence of 100 μ M αGA. (**D**) The increase in p17-Casp3 induced by PAO1 with the JNK inhibitor (PAO1 + SP) in primary HAECs was reduced in the presence of 100 μ M αGA. (**E**) Quantitative analysis of HAECs infected with PAO1 for 16 h in the presence of the JNK inhibitor alone (SP) or in combination with αGA. *n* = 6, **p* < 0.05. (**F**) Detection of apoptosis after 8 h of infection with PAO1 by confocal microscopy of annexin V fluorescent staining (green). Annexin V staining was enhanced in the presence of 10 μ M of the gap junction inhibitor αGA (PAO1 + SP + αGA). Nuclei are stained in blue with DAPI. Scale bar, 10 μ m. (**G**) Quantitative analysis of the annexin V staining experiments. DMSO was used as vehicle (Veh). *n* = 6 images, **p* < 0.05 compared with unstimulated control (CTRL), **p* < 0.05.

The Journal of Immunology

6-8 h; this activation was markedly enhanced 8 h postinfection in the presence of the JNK inhibitor SP. PAO1-induced caspase-3 activation was unaffected in the presence of the p38 inhibitor SB (Supplemental Fig. 2A). We also screened for active caspase-3 expression in Calu-3 cells exposed to TNF-a, HK-PAO1, and live PAO1. Caspase-3 activation, however, was only detected with live PAO1 (Supplemental Fig. 2B), indicating that PAO1 infection is essential to trigger apoptosis. As expected, the ability of the fliC mutant to trigger apoptosis was strongly attenuated as compared with wild-type PAO1 (Fig. 4B). Interestingly, we observed that the increase of caspase-3 expression by PAO1 and SP was prevented in the presence of α GA (Fig. 4C), suggesting for a link between gap junctional communication and apoptosis in Calu-3 cells. Strong apoptosis was detected in primary HAECs infected for 16 h with PAO1 (Supplemental Fig. 2C). Activated caspase-3 induced by PAO1 in combination with the JNK inhibitor was also markedly reduced in HAECs pretreated with aGA (Fig. 4D, 4E), confirming the relationship between gap junctional communication and apoptosis in primary HAECs. Finally, the modulation of PAO1-induced apoptosis by JNK inhibition was verified in Calu-3 cells by confocal detection of exogenous annexin V, which binds to the membrane of apoptotic cells. Thus, annexin V binding, which was induced by PAO1, was further increased in the presence of SP (Fig. 4F, 4G). The latter effect was prevented in the presence of aGA (Fig. 4F, 4G).

To demonstrate a causal relationship between gap junctions and caspase-3 activation during JNK inhibition, we developed a Cx43 gene-silencing strategy via lentiviral expression of a specific shRNA (shCx43). Fig. 5A and 5B show the efficiency of the shCx43 in reducing the expression and function of Cx43 as compared with Calu-3 cells infected with a lentivirus expressing



FIGURE 5. Cx43 channels are required for PAO1-induced apoptosis. A silencing strategy by lentiviral expression of a specific Cx43 shRNA (shCx43) was used to knockdown Cx43, as revealed at the protein level by Western blot (**A**) and at the functional level by dye coupling (**B**). A scramble shRNA (shCTRL) was used in parallel for control experiments. n = 16 dye injections, *p < 0.05. (**C**) Knockdown of Cx43 by shCx43 reduced caspase-3 activation induced by PAO1 (MOI 5) and the JNK SP600125 (SP, 10 μ M) inhibitor at 8 h, as revealed by Western blot for p17-Casp3 (*top panel*), GAPDH (*middle panel*), and Cx43 (*bottom panel*). (**D**) Quantitative analysis from a total of three to four experiments, *p < 0.05.

4809

a control shRNA (shCTRL). As shown in Fig. 5C and 5D, the activation of caspase-3 in response to PAO1 and JNK inhibition was prevented in cells with reduced Cx43 expression. These results indicate that Cx43-mediated gap junctional communication exerts a proapoptotic role in PAO1-infected airway epithelial cells, whereas JNK signaling acts as a negative regulator of Cx43 function.

CFTR exerts a negative feedback on PAO1-dependent JNK signaling cascade

JNK signaling appears as a key regulator of Cx43 expression and apoptosis in PAO1-infected Calu-3 cells. We thus monitored JNK activation at various times following infection via a specific Ab, recognizing the two main isoforms (pp46 and pp54) of phosphorylated JNK (p-JNK). We found that PAO1 transiently increased p-JNK, whereas total JNK expression was unchanged (Fig. 6A). Due to unavoidable variability in host–pathogen interaction experiments, p-JNK could be detected from 30 min up to 6 h following infection with the live bacteria; the peak of JNK phosphorylation was usually observed 2–4 h postinfection. As expected, the *fliC* mutant had no effect on p-JNK (Fig. 6A).

CFTR is endogenously expressed in Calu-3 cells, but its level of expression was not affected by PAO1 infection (Supplemental Fig. 3A). CFTR short-circuit current monitored in Ussing chamber was efficiently blocked by the CFTR inhibitor GlyH-101 (Supplemental Fig. 3B). Interestingly, we observed that CFTR inhibition by GlyH-101 markedly increased PAO1-induced JNK phosphorylation (Fig. 6B). Although time of detection of the peak of phosphorylation was variable between experiments (Supplemental Fig. 3C, 3D), both whole and peak p-JNK signals were increased in Calu-3 cells exposed to the CFTR inhibitor (Fig. 6C). To demonstrate the contribution of CFTR in the regulation of JNK signaling, we measured p-JNK signals in the CF airway CF15 cell line before and after correction of the CF phenotype by adenoviral-mediated expression of wild-type CFTR (Supplemental Fig. 3E). Thus, we found that exogenous expression of CFTR decreased JNK phosphorylation evoked by PAO1 in this CF cell line, also grown on Transwell inserts for accurate comparison with our Calu-3 cell cultures (Fig. 6D, 6E, Supplemental Fig. 3F, 3G). Finally, we observed in Calu-3 cells that expression of Cx43 (Fig. 7A, 7B), activation of caspase-3 (Fig. 7C), and annexin V staining (Fig. 7D, 7E) were markedly decreased in response to PAO1 infection in the presence of Gly-H101. These results suggest that CFTR activity contributes to the response evoked by P. aeruginosa by exerting a negative feedback on PAO1-induced JNK signaling responses.

Discussion

In the current study, we addressed the connection between cell-tocell communication and the response of airway epithelial cells infected with the CF-associated pathogen *P. aeruginosa*. We report that the *P. aeruginosa* laboratory strain PAO1 induced functional expression of Cx43 in Calu-3 cells. We demonstrate that JNK signaling is critical to the modulation of Cx43 expression, and that Cx43-mediated cell-to-cell communication contributes to apoptosis but not inflammation of the airway epithelium. We further show that CFTR negatively regulates JNK activity. The tightly regulated expression of Cx43 may confer in normal airway epithelia a mechanism to balance the inflammatory and apoptotic responses.

Gap junctions and hemichannels are targets of bacterial pathogens and their toxins (reviewed by Ceelen et al.) (7). *S. flexneri*, an invasive bacterium that replicates within intestinal epithelial cells, received particular attention. The activity of connexin-made

Cx43 AND EPITHELIAL APOPTOSIS IN RESPONSE TO P. AERUGINOSA



FIGURE 6. CFTR activity regulates PAO1-induced JNK signaling in Calu-3 cells. (**A**) Total JNK expression (*bottom panel*) and p-JNK (*top panel*) in Calu-3 cells infected (MOI 5) by wild-type PAO1 (*wt*) or the *flic* flagellin mutant was evaluated as a function of time by Western blots. These blots are representative of three experiments. Molecular mass (in kDa) markers are indicated on the *right side* of the blots. (**B**) Western blots showing that CFTR inhibition with 10 μ M GlyH-101 (GlyH) consequently enhanced p-JNK detection with time. (**C**) Quantitative analysis of the effects of GlyH-101 (10 μ M) on the two main isoforms of p-JNK (pp46 and pp54). Quantification was made for the whole and peak of p-JNK signals. DMSO was used as vehicle (Veh). n = 4, *p < 0.05. (**D**) Western blots showing that correction of CF₁₅ cells by adenoviral-mediated expression of wild-type CFTR decreased p-JNK detection following PAO1 (MOI 5) infection. (**E**) Quantitative analysis of the pp46 and pp54 signals (whole and peak) in PAO1-infected CF₁₅ cells before and after CFTR expression (CF15-CFTR). n = 4, *p < 0.05.

hemichannels was found crucial to the invasion and dissemination of this microorganism in intestinal epithelial cells (21, 22). More recently, it was reported in an intestinal cell line that gap junction channels favor the cell-to-cell spread of an inflammatory response dominated by IL-8 production upon S. flexneri internalization and activation of the intracellular pattern recognition receptor Nod1 in the infected cells (11). Low incidence of P. aeruginosa internalization has been previously reported (23, 24). This phenomenon was, however, not observed in our cultures of polarized Calu-3 cells. Cell polarization was confirmed by the high transepithelial resistance reached. In a close cell culture system, long-term infection led to epithelium destruction due to excessive bacterial toxin and virulence factor production. Even under these conditions, we observed that PAO1 transmigrate between epithelial cells to accumulate on the basal side of the epithelium without being obviously internalized. Thus,

activation of innate immune response in this system relies on the interaction of pathogen-associated patterns with epithelial surface receptors, as also suggested by the observation that HK-PAO1 induced Cx43 expression and IL-8 release in Calu-3 cells. We found that a flagellin-deficient PAO1 mutant failed to induce Cx43 expression as well as IL-8 secretion. Infection of Calu-3 cells with fliC strain in the presence of purified flagellin restored the induction of Cx43, indicating that activation of an innate immune response in airway epithelia by PAO1 requires the binding of this bacterial component to pathogen recognition receptors. In vertebrates, at least two major types of flagellin receptors have been identified, as follows: surface TLR5 (25) and intracellular NLRC4 inflammasome (26, 27). Although TLR5 is expressed in our cell system, we cannot rule out that other signaling pathways like the NLRC4 inflammasome are involved in the host response to PAO1 (28). Of note, we did not detect the production of the inflamma-

The Journal of Immunology

FIGURE 7. CFTR activity contributes to PAO1induced apoptosis in Calu-3 cells. Western blot (A) and quantitative analysis (B) of CFTR inhibition with 10 µM GlyH-101 (GlyH) on Cx43 expression in Calu-3 cells infected with PAO1 (MOI 5) for 6 h. n = 4. *p < 0.05. (**C**) Western blot showing that CFTR inhibition with GlyH-101 (10 $\mu M)$ decreased p17-Casp3 detection in Calu-3 cells infected with PAO1 (MOI 5). (D) Detection of apoptosis after 6 h of infection with PAO1 (MOI 5) by confocal microscopy of annexin V fluorescent staining (green). Annexin V staining was reduced in the presence of 10 µM GlyH-101. Nuclei are stained in blue with DAPI. Scale bar, 10 µm. (E) Quantitative analysis of the annexin V staining experiments. n = 6 images, *p < 0.05. In all panels, DMSO was used as vehicle (Veh).



some cytokine IL-1 β in the medium of infected Calu-3 cells (data not shown).

Using a variety of protein kinase inhibitors, we have identified p38 and JNK as key modulators of PAO1-induced Cx43 expression. Interestingly, p38 stimulated Cx43 expression, whereas JNK exerted a negative regulation. In epithelial cells, the opposite regulation of Cx43 expression by p38 and JNK has been reported in keratinocytes and mammary glands in response to TNF- α and TGF-B, respectively (29, 30). JNK was also pointed out as an important mediator of stress-induced Cx43 downregulation in the failing heart (31). p38 was previously shown to activate CFTRdependent chloride secretion in response to flagellin stimulation, which is necessary for efficient water transport and mucus hydration (32). Interestingly, gap junctions were also involved in CFTR function and airway surface liquid hydration (12). Thus, Cx43 induction by PAO1 can be considered as a component of the response of airway epithelial cells to innate immune activation, leading to a regulated increase in gap junctional intercellular communication.

We did not detect quantitative differences in the release of the proinflammatory chemokine IL-8 by airway epithelial cells treated with gap junction blockers. These results are of importance regarding the previous demonstration that gap junctions were required to spread signals to activate MAPKs in neighbors of intestinal epithelial cells infected with S. flexneri, a mechanism thought to amplify IL-8 production (11). In contrast to this finding, we report in this study that Cx43 is a target of MAPKs but does not contribute efficiently to the modulation of IL-8 secretion of airway epithelial cells in response to PAO1 infection. It is worth pointing out that a role for gap junctions in the propagation of calcium waves evoked by TLR2 stimulation was shown to transiently increase IL-8 secretion in airway epithelial cells (9). Mechanisms of intercellular communication independent of gap junctions may also coexist, as it was recently reported in intestinal epithelial cells infected with Listeria monocytogenes (33). Collectively, these observations may indicate that involvement of gap junctions in the spreading of proinflammatory signals may be dependent on the type of pattern-recognition receptors that are activated and/or of toxins that are released by pathogens.

Infection with P. aeruginosa causes apoptosis of airway epithelial cells, a mechanism that was shown to involve flagellin and JNK (17-20). Indeed, the ability of the *fliC* mutant to induce apoptosis was strongly attenuated as compared with wild-type PAO1, whereas HK-PAO1 or the inflammatory mediator TNF- α did not cause apoptosis. Therefore, PAO1 infection is essential to trigger apoptosis, but the epithelial innate immune response induced by flagellin is important to modulate the strength of the apoptotic signals. Moreover, we found that JNK inhibition enhanced PAO1-induced caspase-3 activation and annexin V binding to the surface Calu-3 cells, suggesting that the stress-activated protein kinase negatively regulates apoptosis. In addition, our data unmasked the contribution of Cx43-mediated gap junctional communication on the extent of apoptosis. In this regard, the lower extent of epithelial apoptosis observed in response to fliC strain might be due to the lack of Cx43 modulation. There is accumulating evidence that gap junctions may facilitate the intercellular diffusion of death signals and/or may initiate apoptosis during disruption of homeostasis (34). However, the nature of the intercellular cell death molecules remains elusive, and the exact contribution of connexin channels still remains controversial (35). Importantly, the relationship between gap junctional communication and apoptosis was confirmed in primary HAECs infected with PAO1.

Lung infection with *P. aeruginosa* is a hallmark of CF, although the mechanisms underlying enhanced affinity of airway epithelial cells to this pathogen are still poorly understood. To date the links with CFTR are not known. In this study, we show that CFTR contributes to the response evoked by PAO1 by exerting a negative feedback on JNK signaling cascade. Pharmacological inhibition of CFTR activity led to enhanced duration of PAO1-induced JNK activity, whereas correction of the CF phenotype in a homozygous F508del airway epithelial cell line (CF₁₅ cells) reduced p-JNK detection. Our results are consistent with those of Saadane et al. (36), who reported increased p-JNK in CF airway epithelial cell lines and in primary necropsy human tracheal epithelial cells treated with a CFTR inhibitor. Clearly, activation of inflammation, apoptosis, and fluid transport by airway epithelia during

Cx43 AND EPITHELIAL APOPTOSIS IN RESPONSE TO P. AERUGINOSA

P. aeruginosa are central to host-defense mechanisms. Excessive JNK activation, however, may have major consequences, including longer expression of proinflammatory genes and strong inhibition of Cx43 expression, thus decreasing fluid transport and apoptosis. We suggest in this study that these events are related in CF airway epithelial cells by enhanced PAO1-induced JNK activity due to defective CFTR function. Our results also suggest that abnormal regulation of JNK signaling may provide an explanation to the misbalance between inflammation and apoptosis induced by P. aeruginosa in the CF disease. The molecular mechanism of JNK inhibition by CFTR remains, however, to be elucidated.

Acknowledgments

We thank Dr. Giulio Cabrini (University of Verona) for the gift of the heatkilled PAO1 and for performing preliminary experiments. We thank Joanna Bou Saab, Richard Ruez, and Brenda Kwak for helpful discussion during the progression of this project. We thank Sergei Startchik from the BioImaging Core Facility for the assistance in quantification of annexin V staining.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- 1. Bonazzi, M., and P. Cossart. 2011. Impenetrable barriers or entry portals? The role of cell-cell adhesion during infection. *J. Cell Biol.* 195: 349–358. 2. Pier, G. B. 2007. Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide: a major virulence
- factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. [Published erratum appears in 2007 Int. J. Med. Microbiol. 297: 641.] Int. J. Med. Microbiol. 297: 277-295
- Boucher, R. C. 2007. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface Doublet, N. C. 2007. Cystel norosis, a utscale of validation of an way surface dehydration. *Trends Mol. Med.* 13: 231–240.
 Engel, J., and P. Balachandran. 2009. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III
- effectors in disease. Curr. Opin. Microbiol. 12: 61-66.
- Song, D. H., and J. O. Lee. 2012. Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors. *Immunol. Rev.* 250: 216–229. 5.
- Jacquot, J., O. Tabary, and A. Clement. 2008. Hyperinflammation in airways of cystic fibrosis patients: what's new? *Expert Rev. Mol. Diagn.* 8: 359–363.
- Ceelen, L., F. Haesebrouck, T. Vanhaecke, V. Rogiers, and M. Vinken. 2011. Modulation of connexin signaling by bacterial pathogens and their toxins. *Cell*.
- Molutatori of contextn signaling by oacterial pathogens and their toxins. *Cett. Mol. Life Sci.* 68: 3047–3064.
 Laird, D. W. 2010. The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trends Cell Biol.* 20: 92–101.
 Martin, F. J., and A. S. Prince. 2008. TLR2 regulates gap junction intercellular communication in airway cells. *J. Immunol.* 180: 4986–4993.
 Dependity S. C. Facility F. A. da Zwart Stern S. Lung M. A. up Stagnad, and
- 10. Donnelly, S., G. English, E. A. de Zwart-Storm, S. Lang, M. A. van Steensel, and P. E. Martin. 2012. Differential susceptibility of Cx26 mutations associated with epidermal dysplasias to peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Exp. Dermatol.* 21: 592–598.
- Kasper, C. A., I. Šorg, C. Schmutz, T. Tschon, H. Wischnewski, M. L. Kim, and C. Arrieumerlou. 2010. Cell-cell propagation of NF-κB transcription factor and MAP kinase activation amplifies innate immunity against bacterial infection. Immunity 33: 804–816.
- Scheckenbach, K. E., D. Losa, T. Dudez, M. Bacchetta, S. O'Grady, S. Crespin, and M. Chanson. 2011. Prostaglandin E₂ regulation of cystic fibrosis trans-membrane conductance regulator activity and airway surface liquid volume requires gap junctional communication. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 44: 74–82.
 Chanson, M., P. Y. Berclaz, I. Scerri, T. Dudez, K. Wernke-Dollries, L. Pizurki, A. Pavineri, M. A. Evidas, and S. Sutta, 2001. Paeulotion of case investional
- A. Pavirani, M. A. Fiedler, and S. Suter. 2001. Regulation of gap junctional communication by a pro-inflammatory cytokine in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-expressing but not cystic fibrosis airway cells. Am. J. Pathol. 158: 1775-1784.
- Köhler, T., L. K. Curty, F. Barja, C. van Delden, and J. C. Pechère. 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* 182: 5990–5996.
 Granio, O., K. J. Ashbourne Excoffon, P. Henning, P. Melin, C. Norez, G. Gonzalez, P. H. Karp, M. K. Magnusson, N. Habib, L. Lindholm, et al. 2010.

Adenovirus 5-fiber 35 chimeric vector mediates efficient apical correction of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator defect in cystic fibrosis primary airway epithelia. Hum. Gene Ther. 21: 251-269.

- Bezzerri, V., M. Borgatti, A. Finotti, A. Tamanini, R. Gambari, and G. Cabrini. 2011. Mapping the transcriptional machinery of the IL-8 gene in human bron-chial epithelial cells. J. Immunol. 187: 6069–6081.
- Grassmé, H., S. Kirschnek, J. Riethmueller, A. Riehle, G. von Kürthy, F. Lang, M. Weller, and E. Gulbins. 2000. CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to Pseudomonas aeruginosa. Science 290: 527-530.
- Jendrossek, V., H. Grassmé, I. Mueller, F. Lang, and E. Gulbins. 2001. Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis involves mitochondria and stress-activated protein kinases. Infect. Immun. 69: 2675–2683.
- 19. Cannon, C. L., M. P. Kowalski, K. S. Stopak, and G. B. Pier. 2003. Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 29: 188-197.
- Cobb, L. M., J. C. Mychaleckyj, D. J. Wozniak, and Y. S. López-Boado. 2004. Pseudomonas aeruginosa flagellin and alginate elicit very distinct gene ex-pression patterns in airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis dis-
- pression patients in the hyperbolic constraint in prediction for cyclic interval in a second patient of the patient in the hyperbolic constraint of the patient interval in the second patient interval interval in the second patient interval inte 21. creases invasion and dissemination of Shigella in epithelial cells. Nat. Cell Biol. 5: 720-726.
- Clair, C., L. Combettes, F. Pierre, P. Sansonetti, and G. Tran Van Nhieu. 2008. 22. Extracellular-loop peptide antibodies reveal a predominant hemichannel orga nization of connexins in polarized intestinal cells. Exp. Cell Res. 314: 1250-1265
- 23. Pier, G. B., M. Grout, and T. S. Zaidi. 1997. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas* aeruginosa from the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12088–12093.
- Esen, M., H. Grassmé, J. Riethmüller, A. Riehle, K. Fassbender, and E. Gulbins 2001. Invasion of human epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa* involves src-like tyrosine kinases p60Src and p59Fyn. *Infect. Immun.* 69: 281–287.
- Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature 410: 1099-1103.
- 26. Franchi, L., A. Amer, M. Body-Malapel, T. D. Kanneganti, N. Ozören, R. Jagirdar, N. Inohara, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, et al. 2006. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. Nat. Immunol. 7: 576-582.
- Miao, E. A., C. M. Alpuche-Aranda, M. Dors, A. E. Clark, M. W. Bader, S. I. Miller, and A. Aderem. 2006. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. Nat. Immunol. 7: 569-575. Cohen, T. S., and A. S. Prince. 2013. Activation of inflammasome signaling
- 28 mediates pathology of acute P. aeruginosa pneumonia. J. Clin. Invest. 123: 1630-1637
- Tacheau, C., J. Fontaine, J. Loy, A. Mauviel, and F. Verrecchia. 2008. TGF-beta induces connexin43 gene expression in normal murine mammary gland epi thelial cells via activation of p38 and PI3K/AKT signaling pathways. J. Cell. Physiol. 217: 759-768.
- Tacheau, C., J. Laboureau, A. Mauviel, and F. Verrecchia. 2008. TNF-alpha represses connexin43 expression in HaCat keratinocytes via activation of JNK signaling. J. Cell. Physiol. 216: 438–444.
- Petrich, B. G., X. Gong, D. L. Lerner, X. Wang, J. H. Brown, J. E. Saffitz, and Y. Wang. 2002. c-Jun N-terminal kinase activation mediates downregulation of connexin43 in cardiomyocytes. Circ. Res. 91: 640-647. 32. Illek, B., Z. Fu, C. Schwarzer, T. Banzon, S. Jalickee, S. S. Miller, and
- T. E. Machen. 2008. Flagellin-stimulated Cl- secretion and innate immune responses in airway epithelia: role for p38. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 295: L531-L542.
- Dolowschiak, T., C. Chassin, S. Ben Mkaddem, T. M. Fuchs, S. Weiss, A. Vandewalle, and M. W. Hornef. 2010. Potentiation of epithelial innate host responses by intercellular communication. *PLoS Pathog.* 6: e1001194. Decrock, E., M. Vinken, E. De Vuyst, D. V. Krysko, K. D'Herde, T. Vanhaecke,
- P. Vandenabeele, V. Rogiers, and L. Leybaert. 2009. Connexin-related signaling
- in cell death: to live or let die? *Cell Death Differ*. 16: 524–536. Decrock, E., D. V. Krysko, M. Vinken, A. Kaczmarek, G. Crispino, M. Bol, N. Wang, M. De Bock, E. De Vuyst, C. C. Naus, et al. 2012. Transfer of IP₃ through gap junctions is critical, but not sufficient, for the spread of apoptosis. *Cell Death Differ.* 19: 947–957.
- Saadane, A., J. Eastman, M. Berger, and T. L. Bonfield. 2011. Parthenolide 36 inhibits ERK and AP-1 which are dysregulated and contribute to excessive IL-8 expression and secretion in cystic fibrosis cells. J. Inflamm. 8: 26.

Annexe 2 : Cx26 regulates proliferation of repairing basal airway epithelial cells

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 52 (2014) 152-160



Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocel

Cx26 regulates proliferation of repairing basal airway epithelial cells*



CrossMark

S. Crespin^a, M. Bacchetta^a, J. Bou Saab^a, P. Tantilipikorn^b, J. Bellec^c, T. Dudez^a, T.H. Nguyen^c, B.R. Kwak^{d,e}, J.S. Lacroix^f, S. Huang^g, L. Wiszniewski^g, M. Chanson^{a,*}



^b Mahidol University, Bangkok, Thailand

^c INSERM UMR 1064, CHU Nantes, ITUN, Nantes, France

^d Department of Pathology and Immunology, University of Geneva, Switzerland

e Department of Internal Medicine – Cardiology, University of Geneva, Switzerland

^f Division of Otho-Rhino-Laryngology, Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland

^g Epithelix Sàrl, Plan-les-Ouates, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history: Received 22 July 2013 Received in revised form 13 February 2014 Accepted 14 February 2014 Available online 22 February 2014

Keywords: Gap junctions Cx26 Cystic fibrosis Proliferation Repair Mucilair

ABSTRACT

The recovery of an intact epithelium following injury is critical for restoration of lung homeostasis, a process that may be altered in cystic fibrosis (CF). In response to injury, progenitor cells in the undamaged areas migrate, proliferate and re-differentiate to regenerate an intact airway epithelium. The mechanisms regulating this regenerative response are, however, not well understood. In a model of circular wound injury of well-differentiated human airway epithelial cell (HAEC) cultures, we identified the gap junction protein Cx26 as an important regulator of cell proliferation. We report that induction of Cx26 in repairing HAECs is associated with cell proliferation. We also show that Cx26 is expressed in a population of CK14positive basal-like cells. Cx26 silencing in immortalized cell lines using siRNA and in primary HAECs using lentiviral-transduced shRNA enhanced Ki67-labeling index and Ki67 mRNA, indicating that Cx26 acts a negative regulator of HAEC proliferation. Cx26 silencing also markedly decreased the transcription of KLF4 in immortalized HAECs. We further show that CF HAECs exhibited deregulated expression of KLF4, Ki67 and Cx26 as well enhanced rate of wound closure in the early response to injury. These results point to an altered repair process of CF HAECs characterized by rapid but desynchronized initiation of HAEC activation and proliferation.

This article is part of a Directed Issue entitled: Cystic fibrosis: From o-mics to cell biology, physiology, and therapeutic advances.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The maintenance of the airway epithelium barrier integrity is required to protect lungs from environmental threats. In human, the pseudostratified airway epithelium is composed of three major cell types, including tall ciliated (CCs), mucus secreting (SCs) and basal (BCs) cells. Compared with other epithelial organs, such as the epidermis and small intestine, the airway epithelium turnover is relatively slow. However, the loss of these cells due to infection, inflammation or injury must be replaced, a process that requires

E-mail address: marc.chanson@hcuge.ch (M. Chanson).

http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2014.02.010

1357-2725/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

the migration and proliferation of local progenitor cells, which gives rise after re-differentiation to all cell types constituting the airway epithelium (Wansleeben et al., 2013). Disruption of the coordination between proliferation and differentiation during this repair process contributes to pathological remodeling of the airway epithelium, as it is commonly observed in respiratory diseases, including cystic fibrosis (CF) (Randell, 2006; Beers and Morrissey, 2011).

Important progress has been made to detect progenitor cells and the underlying mechanisms regulating their fate in the lung (Wansleeben et al., 2013). There is evidence for stem cell niches throughout the airway tree and their capacity to regenerate normal structures has been demonstrated in vitro and in vivo (Borthwick et al., 2001; Hackett et al., 2008; Rock et al., 2009; McQualter and Bertoncello, 2012). Lineage tracing in mice during development, and in adults after injury, suggests that BCs function as long-term stem cells of the airways (Wansleeben et al., 2013). After activation, BCs self-renew and are capable of regenerating CCs and SCs.

cell biology, physiology, and therapeutic advances. * Corresponding author at: Laboratory of Clinical Investigation III, Foundation for

Medical Research, 64 Avenue de la Roseraie, 1205 Geneva 4, Switzerland. Tel.: +41 22 37 24 611; fax: +41 22 34 75 979.

Typical markers of BCs are the transcription factor Trp63 (or p63), cytokeratin (CK)5 and CK14. On the other hand, CK8 is a marker of well-differentiated CCs and SCs that is also detected in early progenitors of these cell lineages during repair (Beers and Morrissey, 2011; Rock et al., 2011; Wansleeben et al., 2013). The mechanisms synchronizing proliferation and differentiation of activated BCs within the repairing human airway epithelium remain, however, poorly known.

Specialized cell junctions are particularly important in cellular functions essential for sustaining epithelia homeostasis. Direct cellto-cell communication via gap junctions provides a low resistance pathway to coordinate multicellular activity via the intercellular diffusion of ions, second messengers and small metabolites (Laird, 2010). Gap junctions are formed by hexameric connexins (Cxs) at the plasma membrane, which are members of a large family of homologous proteins in vertebrates. The pattern of Cx expression by the human respiratory epithelium depends on the stage of differentiation (Chanson and Koval, 2013). For instance, Cx26 expression is elevated during the highly proliferative canalicular phase of development but is decreased with airway differentiation in ferret, mouse and human (Carson et al., 1998). Similarly, Cx26 expression disappears from primary cultures of human airway epithelial cells (HAECs) grown at the air-liquid interface, a process associated with decreased proliferation of HAECs and differentiation to a well-polarized ciliated epithelium (Wiszniewski et al., 2007). No studies have yet investigated the expression of Cx26 during the repair process after injury of the human airway epithelium.

The skin exhibits some analogy with the lung regarding Cx26 expression. Cx26 is expressed in proliferative epidermis during early embryonic development but inhibited at terminal differentiation (Goliger and Paul, 1994; Choudhry et al., 1997). Moreover, mice lacking the Krüppel-like transcription factor 4 gene (klf4), which is known to act as an anti-proliferative gene (McConnell and Yang, 2010), showed severe defects in epidermal barrier acquisition with keratinocyte hyperproliferation and lesions characteristic of psoriasis (Segre et al., 1999; Djalilian et al., 2006). Interestingly, KLF4 was found to bind directly to the Cx26 promoter and repress its transcription, suggesting that enhanced keratinocyte proliferation in Klf4^{-/-} mice is linked to Cx26 expression (Dialilian et al., 2006). Few studies have investigated KLF4 in the respiratory system and the information available has been obtained in developmental and morphogenesis studies (Wani et al., 1999; Cowan et al., 2010). Here, we sought to determine whether Cx26 contributes to proliferation of repairing HAECs in a model of mechanical injury of well-differentiated airway epithelium in primary culture. We also evaluated whether KLF4 regulates Cx26 expression in repairing HAECs. Because a hyperproliferative state has been described in CF HAECs (Voynow et al., 2005; Hajj et al., 2007), we investigated the expression of Cx26 and KLF4in this disease as well.

2. Methods and materials

More detailed information can be found in the online supplement.

2.1. Airway cell cultures

HAECs cultured at the air–liquid interface were prepared as previously described (Wiszniewski et al., 2006). Materials were obtained from patients undergoing surgical endonasal polypectomy or partial middle turbinectomy. Briefly, HAECs obtained by protease digestion of airway biopsies were grown in CnT-17 medium (CELLnTEC, Bern, Switzerland) supplemented with 30 U/ml penicillin and 30 mg/ml streptomycin on flasks coated with PureCol (Advanced BioMatrix, San Diego, CA) until a monolayer was established. HAECs were then isolated, seeded on Transwell inserts and allowed to differentiate at the air–liquid interface for 30–60 day. The basal medium, which consisted of DMEM:F12 (3:1) supplemented with 1.5% Ultroser G (Life Sciences, Zug, Switzerland) and antibiotics, was refreshed every 2 days. For experiments comparing control (Ctrl) and CF epithelia, polarized HAEC cultures (MucilAirTM and MucilAirTM-CF) were provided by Epithelix (Sàrl Epithelix Sàrl, Plan-Les-Ouates, Switzerland). All CF HAEC cultures were generated from patients homozygous for the F508del mutation except 1 patient heterozygous for the F508del mutation and an unknown mutation.

UNCN1T, UNCN2T and UNCN3T human bronchial epithelial cell lines were maintained in the CnT-17 medium supplemented with antibiotics (Fulcher et al., 2009).

2.2. RNA silencing and reverse transcription polymerase chain reaction

UNCN cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) specific for Cx26, KLF2 and KLF4 using Steath RNAiTM siRNAs (Invitrogen, Lucerne, Switzerland). The Stealth RNAiTM siRNA negative controls that do not target (siNT) any known human sequence were used to test for specificity of the silencing strategy.

Primary HAECs were transduced with lentiviral vectors expressing a short hairpin RNA (shRNA) directed against Cx26 or a scramble sequence (shAlter). A GFP reporter gene expression cassette driven by the elongation factor 1 alpha promoter was also contained in the vectors. HAECs seeded on Primaria Petri dishes (Becton Dickinson, Meylan, France) at low density were transduced with lentiviral vectors at an MOI of 10 in CnT-17 medium containing 2 μ g/mL polybrene (Sigma). After 3 days, GFP positive cells were FACS and immediately analyzed for mRNA expression.

Total cellular RNA was isolated from UNCN cells or HAECs and reversed transcribed for qPCR. The thermal cycle (CT) of each gene was detected and subtracted from the CT of 18S to obtain Δ CT to calculate $2^{-\Delta$ CT} or $2^{-\Delta\Delta$ CT} (fold increase).

2.3. Wound closure assay

Reproducible circular wounds were made on well-differentiated HAEC cultures by using an airbrush linked to a pressure regulator. Data were expressed as % of wound closure, 100% representing complete wound closure.

2.4. Western blotting and immunohistochemistry

Western blots and immunofluorescence staining were performed as previously described (Wiszniewski et al., 2007). Immunostaining was performed on UNCN and HAEC cells or frozen sections of human polyps after fixation with 4% paraformaldehyde for 15 min, and on sections of paraffin-embedded HAEC cultures after 1–24 h fixation.

2.5. Statistical analysis

GraphPad Prism software (version 4.03) was used to compare experiments with paired or unpaired *t*-tests, where appropriate. Values are expressed as mean \pm SEM. *P*<0.05 (*) was considered significant.

3. Results

3.1. HAEC repair involves transient proliferation

Primary cultures of HAECs grown at the air-liquid interface for at least 30 days were used. In this model, HAECs reproduced the 3D

S. Crespin et al. / The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 52 (2014) 152–160



Fig. 1. Proliferation is induced in response to wounding of a 3D model of HAECs in primary cultures, (a) HAECS were cultured at the air-liquid interface on Transwell porous filters undercoated with a feeder layer of human fibroblasts. Representative images of a well differentiated culture taken at subsequent times post-wounding are shown (top left panels). This allowed delineating the undamaged area (back) by the wound and the repairing area (front) of HAECs that progressively covered the denuded area (top right panel). Note that wound was closed 48 h after injury in this experiment. (b) A paraffin section made in a culture 48 h after wounding to illustrate the histology of HAECs undergoing repair. Bar $= 200 \,\mu$ m. (c) Time course of wound closure measured in Crt HAECs (n = 7) undergoing repair after wounding. (d) Representative images of Ki67 immunostaining (red) on HAECs cultures 12, 24, 36, 48, 60, 72 and 96 h post-wounding. The dotted line in images at 12 h and 24 h post-wounding delineates the denuded area. Bar $= 100 \,\mu$ m. (e) The Ki67-labeling index (%) was determined in the front and back areas of HAECs undergoing repair at various times post-wounding. **P* <0.05 front vs. back areas; n = 4.

structure of well-differentiated, non-proliferating, airway epitheliums with BCs, SCs and CCs in a context devoid of exogenous infection or inflammation (Wiszniewski et al., 2006). To induce BC activation, a circular wound was mechanically made and repair was monitored as a function of time. As shown in Fig. 1a, two areas were defined: HAECs at the periphery of the wound (back) and repairing cells that progressively cover the denuded region (front) with time (top right panel). The undamaged HAECs at the back of the wound therefore represent the population of cells that initiate the repair process. Histology of the transition between back and front areas shows the decrease in height of the repairing epithelium (Fig. 1b). The kinetic of wound healing was evaluated from timelapse microscopy and expressed as percentage of wound repair (Fig. 1c). The wounded area was covered by 50% within 24 h and wound healing was completed after 48 h in 6 out of 7 HAEC cultures. The wound healing rate, which for a concentric injury could be

reliably measured at early time points of repair, gave a mean \pm SEM value of 0.16 \pm 0.03 mm²/h (*n* = 7) and of 0.19 \pm 0.02 mm²/h (*n* = 7) during the 12 h and 24 h post-wounding, respectively.

HAEC proliferation in response to injury was monitored by immunostaining of the nuclear proliferation marker Ki67. Ki67 expression was detected at the wound edge already 12 h after wounding and peaked over a period ranging between 48 and 60 h, around the time of wound closure (Fig. 1d). The number of Ki67positive cells decreased dramatically at later times after complete closure of the wound (Fig. 1d). Cell proliferation, measured at the back and front areas, was quantified by determining the Ki67labeling index on HAEC cultures from 4 different donors (Fig. 1e). Although variable between primary cultures from different donors, a strong increase of the Ki67-labeling index at the front area of repairing cells but not in the undamaged cells at the back area was observed (Fig. 1e).

These results indicate that well-differentiated HAECs can initiate wound repair in response to injury *via* a process that involved migration and induction of proliferation. Proliferation ceased, however, after completion of wound closure.

3.2. Cx26 expression is induced in repairing HAECs

The human airway epithelium expresses different types of gap junction proteins; however, Cx26 was not detectable in welldifferentiated primary HAEC cultures (Wiszniewski et al., 2007). Upon wounding, we observed that Cx26 expression is induced in repairing HAECs; at 12h post-wounding, intracellular and some junctional staining could be observed while Cx26 localized only at cell-cell contacts 48 h after injury (Fig. 2a). Quantitative PCR showed a 2-fold increase (P<0.04) in Cx26 mRNA within 12 h postwounding, a level that was maintained in repairing cells up to 48 h (Fig. 2b). Quantification of the immunofluorescence signal in cultures from 5 donors showed changes in Cx26 signal with a time course that closely resembles the one of Ki67. Cx26 is detectable 12 h after wounding at the edge of the wound and its expression markedly increased with time to peak at a 48-60 h after injury in the front area (Fig. 2c). Like Ki67, Cx26 was transiently detected in repairing HAECs, the expression of the protein decreasing from 60 h on after complete closure of the wound (Fig. 2c)

To examine the relationship between Ki67 and Cx26, we performed co-immunostainings in repairing HAECs. As shown in Supplemental Fig. 1a, this approach revealed complex patterns of expression with immunodetection of clusters of cells positive only for Cx26 or for Ki67, as well as clusters of cells positive for both Cx26 and Ki67. The expression of Cx26 in Ki67-negative and Ki67positive cells was confirmed by confocal microscopy (Supplemental Fig. 1b). This complex and heterogeneous pattern of Cx26 and Ki67 expression within the repairing area was observed at all time points after wounding. Both cell migration and proliferation contribute to the spatiotemporal dynamic of the wound healing process. In order to evaluate the relative contribution of these processes on Cx26 expression, we have treated HAEC cultures wounded for 48 h. the time at which Cx26 is maximally induced, with Y27632 or mitomycine C (Fig. 2d). Y27632 is a widely used inhibitor of cell migration by blocking RhoA-dependent reorganization of the Factin cytoskeleton. Interestingly, the detection of both Cx26 and Ki67 was increased in response to the cell migration inhibitor. In contrast, the expression of both Cx26 and Ki67 was virtually abolished in the presence of mitomycine C, an inhibitor of cell division. These results suggest that cell division is required to trigger the expression of Cx26 in repairing HAECs.

Repairing HAECs enter a program of proliferation and redifferentiation that can be followed by the expression of specific cell markers (Wansleeben et al., 2013). As shown in Fig. 3, The typical expression pattern of these markers was recapitulated in primary



S. Crespin et al. / The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 52 (2014) 152-160

Fig. 2. Cx26 expression in Ctrl HAECs in response to wounding. (a) Representative confocal images of Cx26 immuno-detection in response to wounding. Typically, Cx26 (green) was observed in the front areas of repairing HAECs already 12 h post-wounding. Highest levels of Cx26 expression was detected 48 h post-wounding and decreased thereafter to almost basal levels after 96 h of repair. Nuclei were stained with DAPI (blue). Bar = $25 \,\mu$ m. (b) Changes in Cx26 mRNA was monitored by RT-qPCR at different times post-wounding. Values were calculated as $2^{-\Delta CT}$ and normalized to the mRNA level at time 0. *P < 0.04 front vs. back areas; n = 4-7. (c) The Cx26 signal was quantified (integrated area) in the front and back areas of HAECs undergoing repair for different times post-wounding. *P<0.02 front vs. back areas; n = 5. (d) Confocal images (with x - z projections) of co-immunostaining for Cx26 (green) and Ki67 (red) in repairing HAECs 24 h post-wounding before (left panel) and after treatment with 100 μ M Y27632 (middle panel) or 1 μ g/ml mitomycin C (right panel). Nuclei stained with DAPI are in blue. Bar= 25 μ m.

HAEC cultures with the detection of CK5 and CK14 in BCs, and of CK8 in CCs. We next evaluated for their expression in repairing HAECs 24 h after wounding, an early time point at which the expression of Cx26 is markedly induced. As shown in Fig. 3a (top right panel), the first layer of cells covering the denuded area was made of CK5-positive cells. We also performed co-immunostaining for Cx26 and CK8. As shown on a gallery of confocal microscope images in Fig. 3b, the expression of Cx26 was restricted to the basal layer of HAECs in the front area. CK8-expressing cells were located in the superior layer of repairing HAECs. Finally, and consistent with its basal localization, we found that Cx26 was expressed in a population of HAECs positive for CK14 (Fig. 3c).

These results indicate that in repairing HAECs, Cx26 expression is detected at the front area of the wound in BCs positive for CK14.

3.3. Cx26 modulate airway epithelial cell proliferation

To further study the relationship between Cx26 and cell proliferation, we searched for human airway epithelial cell lines expressing this gap junction protein. Recently, HAECs from three donors have been immortalized by introduction of Bmi-1 and the catalytic subunit of telomerase (hTERT) into primary bronchial cells (Fulcher et al., 2009). These three Bmi-1/hTERT airway epithelial cell lines (UNCN1T, UNCN2T and UNCN3T; globally referred to as UNCN cells) express high levels of Cx26 at cell-cell contacts as revealed by immunostaining and Western blot (Supplemental Fig. 2a and b). We next developed a silencing strategy using siRNAs to reduce functional expression of Cx26 in these cell lines. Three different siRNAs and a mixture of them (siRNAMix) were tested on all three UNCN cell lines. As shown in Supplemental Fig. 2c, we found that siRNA2 and siRNAMix (hereafter referred to as siCx26) were the most efficient (P < 0.01). Next, we evaluated the effects of siCx26 on the Ki67-labeling index of UNCN cells as compared to cells transfected with a non-targeting control siRNA (siNT; Fig. 4a).

In skin, KLF4 represses the expression of Cx26 and exerts antiproliferative effects (McConnell and Yang, 2010). To investigate whether KLF4 is also involved in the regulation of Cx26 and proliferation in airway epithelial cells, we performed RT-qPCR on mRNAs isolated from UNCN1T and UNCN2T cells transfected with siCx26 or a siRNA against KLF4 (siKLF4). Surprisingly, siKLF4 had no effect on Cx26 mRNA levels in these cells (Fig. 4b). In contrast, we found that silencing Cx26 decreased mRNA levels of KLF4 (Fig. 4c). We also evaluated the effect of silencing of KLF2, a typical lung Krüppel-like



S. Crespin et al. / The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 52 (2014) 152–160



Fig. 3. Cx26 is expressed in a basal-like cell population. (a) Immunodetection of CK5, CK14 and CK8 on HAEC primary cultures. Basal cells are positive for CK5 (red, left top panel) and CK14 (red, bottom right panel) while tall ciliated cells are positive for CK8 (green, bottom left panel; arrows show negative basal cells). After wounding, the cells that migrate out at the front edge are positive for CK5 (red, right top panel, arrow). Bar = 40 μ m in top panels and 25 μ m in the bottom panels. (b) Co-immunostaining for Cx26 (green) and CK8 (red) in repairing HAECs at the front area 48 h after wounding, Gallery of successive confocal images (from 1 to 8, taken every 2 μ m) through the height of the airway epithelium (apical to basal) is shown. Cx26 is mostly localized in basal cells (images 7 and 8) below differentiating cells expressing CK8. Bar = 25 μ m. (c) Representative confocal images (corresponding to height similar to images 7 and 8 in panel b) showing the co-expression of Cx26 and CK14 in repairing HAECs for 24 h. Nuclei are stained with DAPI (blue). Bar = 25 μ m.

Factor with high expression in this organ (Wani et al., 1999). KLF2 silencing had no effect of Cx26 expression nor did Cx26 silencing affect KLF2 expression in UNCN1T and UNCN2T cells (Fig. 4b and d). Of note, the efficiency of each siRNA (siCx26, siKLF4 and siKLF2) was verified and confirmed at the mRNA level in each experiment (Fig. 4b–d).

Gene silencing of basal cells in well-differentiated HAEC cultures could not be achieved. To confirm the anti-proliferative effect of Cx26, non-differentiated HAECs obtained from 4 patients were cultured on Petri dishes and transduced by lentiviral vectors coexpressing green fluorescent protein (GFP) and specific shRNA sequences targeting the mRNAs of Cx26 (shCx26) or a control shRNA (shAlter). Cx26 and Ki67 mRNA levels were determined by RT-qPCR in transduced HAECs expressing GFP. Relative to shAlter, shC26 efficiently decreased Cx26 mRNA by 77% (0.23 ± 0.06, n = 4; P < 0.01). In 3 out 4 experiments, an increased of Ki67 mRNA (1.8 ± 0.3; P < 0.05) was observed. In contrast, shCx26 did not affect (1.1 ± 0.2, n = 4) KLF4 mRNA. However, it is important to note that in non-differentiated HAECs, the mRNA level of this gene was extremely low ($2^{-\Delta CT}$: 2.8 $10^{-5} \pm 4 \times 10^{-6}$, n = 4).

All together, these results indicate that Cx26 negatively regulates cell proliferation and suggest that transcription of Cx26 in HAECs is not dependent on KLF4 or KLF2.

3.4. Cx26 expression, KLF4 transcription and proliferation in repairing CF HAECs

As abnormal epithelial repair is a hallmark of CF (Randell, 2006; Beers and Morrissey, 2011), we therefore investigated Cx26 and KLF4 expression as well as proliferation in HAECs obtained from CF





Fig. 4. (a) Transfection of UNCN cells with siCx26 increased the number of proliferative cells, as detected by Ki67 immunostaining. Values are expressed as ratios to the number of Ki67 cells measured in cells treated with lipofectamine only (Lipo). The number of Ki67-positive cells in cells transfected with a control siRNA (siNT) is also shown. Values were obtained after transfection of UNCN1T (repeated 3 times), UNCN2T (repeated 4 times) and UNCN3T (1 time) with siCx26, Because no difference was observed between the three lines (UNCN1T: 2.3 ± 0.3 ; UNCN2T: 2.4 ± 0.8 ; UNCN3T: 2.4 ± 0.3 ; UNCN3T: 2.4 ± 0

patients. We have first verified the expression levels of Cx26 and KLF4 in well-differentiated primary cultures of CF HAECs by RTqPCR. As shown in Fig. 5a, Cx26 and KLF4 expression was similar in control and CF HAECs; KLF4 mRNA level was 10 times higher as compared to non-differentiated HAECs. We then monitored the expression of KLF4 in repairing HAECs following injury. As shown in Fig. 5b, the relative changes of KLF4 mRNA to the non-injured conditions (0 h) showed a transient increase during the early time points after injury in control cultures. KLF4 mRNA increased rapidly following airway epithelium injury and progressively decreased down to initial values. Importantly, this transient modulation in KLF4 mRNA transcription was not observed in CF HAECs; the mRNA levels for KLF remained unchanged during wound repair (Fig. 5c). We have also monitored the time course of KLF2 mRNA level during repair of control and CF HAECs. Again, like KLF4, the transient induction of KLF2 mRNA at 12 h post-wounding was not observed in CF HAECs (Fig. 5b).

The Ki67-labeling index was then determined at front and back areas of repairing CF HAECs during wound repair. Similar to control cultures, the Ki67-labeling index increased after wounding in the front area at 12h and remained elevated for up to 60h post-wounding before decreasing progressively at later time points (Fig. 6a). In contrast with control HAECs that showed no proliferation in the back area (Fig. 1e), Ki67-positive cells were readily detected in the back area of repairing CF HAEC cultures at all time points. Representative examples of Ki67 detection during repair in Ctrl HAECs and CF HAECs are shown in Supplemental Fig. 3. Indeed, the Ki67 signal is present in an organized concentric manner around the wound edge but restricted to the front area in all Ctrl HAECs, whereas a heterogeneous disorganized signal is detected in repairing CF HAECs from 3 out of 4 donors. Cx26 expression was also detected in the back area in CF HAECs undergoing repair, as quantified in Fig. 6b. Finally, we measured the time course of wound closure in CF HAEC cultures (Fig. 6c). CF HAECs showed a faster kinetic (P < 0.05) of wound closure at 12 h and 24 h post-injury as compared to control HAECs (Fig. 6c). The rate of wound healing was $0.23 \pm 0.02 \text{ mm}^2/\text{h}$ (n = 5; P < 0.05) during the first 12 h of repair in CF HAECs. No significant differences in wound healing rates between control and CF HAECs were, however, observed for later time points. The early difference may be explained by a different composition of control and CF cell population obtained from donors to generate the primary cultures. In fact, HAECs obtained from CF patients may exhibit enhanced amount of activated stem cells in response to chronic inflammation and infection. To evaluate this hypothesis, we quantified by RT-qPCR the expression levels of Sox2, a marker of airway epithelial cell differentiation (Fig. 6d), as well as of unique stem cell markers (Nanog and OCT3/4) in Ctrl and CF HAEC cultures before wounding (Fig. 6e and f). Comparable expression levels of Sox2, Nanog and OCT3/4 mRNAs were however observed in Ctrl and CF HAEC cultures.

Collectively, these results indicate that the transcription factors KLF4 and KLF2 are rapidly induced following epithelial injury in Ctrl HAECs undergoing repair. This rapid induction is lost in CF HAECs.

4. Discussion

The mechanisms regulating the maintenance of the human pseudostratified airway epithelium are poorly known. In this study, we evaluated the wound repair process of well-differentiated HAEC cultures. We report that upon injury, expression of the gap junction protein Cx26 is transiently induced in a population of basal-like cells, a phenomenon associated with ceased proliferation of HAECs. We further show that in response to injury, CF HAECs exhibit altered coordination of Cx26 expression and proliferation as well as an enhanced rate of wound healing at the early phase of the repair process. Finally, the early and transient induction of KLF4, a transcription factor known to negatively regulate cell proliferation, was absent in CF HAECs undergoing repair.

It is well established that gap junctions contribute to cell homeostasis by allowing the intercellular exchange of essential growth regulators, including ions, nucleotides, sugars, small peptides, RNAs (Kardami et al., 2007; Vinken et al., 2011), and microRNAs (Lim





Fig. 5. Absence of KLF4 mRNA induction in response to injury of CF HAECs. (a) RT-qPCR for Cx26 and KLF4 mRNAs obtained from control (Ctrl) and CF HAECs. Values were calculated as $2^{-\Delta CT}$; Cx26: n = 9 (Ctrl HAECs) and 8 (CF HAECs), respectively, KLF4: n = 8 (Ctrl HAECs) and 5 (CF HAECs), respectively, (b) Relative changes in KLF4 (left panel) and KLF2 (right panel) mRNAs in Ctrl HAECs undergoing repair for increasing times after wounding, (c) Relative changes in KLF4 (left panel) and KLF2 (right panel) mRNAs in Ctrl HAECs undergoing the after wounding. Values were calculated as $2^{-\Delta CT}$ and normalized to values measured in non-wounded cultures (time 0), n = 3 - 9; P < 0.05.

et al., 2011). Cx26 expression is virtually absent in the normal adult airway epithelium (Chanson and Koval, 2013). We observed that its expression is induced in HAECs undergoing wound repair. Proliferation and Cx26 expression were transiently increased following injury but both events terminated after wound closure was completed. Furthermore, Cx26 expression was induced by proliferation but abolished by inhibitors of cell division. One interpretation of these results is that the expression of Cx26 is triggered in daughter cells of an expanding, but not yet differentiating, population of BCs, in response to proliferative signals generated by the injured epithelium. Cx26 was not detected in CK8-positive cells, which represent early progenitors of SC and CC lineages (Rock et al., 2011), but is present in a population of CK14-positive HAECs. An early report in the rat tracheal epithelium and later mouse genetic-lineage tracing studies showed that the proportion of CK14-expressing BCs transiently increased following epithelial damage, suggesting that CK14 is up-regulated when BCs are activated (Hong et al., 2004; Ghosh et al., 2010). Thus, our results suggest that Cx26 expression is induced in BCs activated for proliferation during the repair process; Cx26 expression, however, is strongly repressed with differentiation. This interpretation is consistent with recent studies showing that a transient population of CK5/CK14-positive basal like cells is capable of self-renewal and can regenerate SCs and CCs (Rock et al., 2009; Kumar et al., 2011).

Cx26 exerts an anti-proliferative role as evaluated by determining the Ki67-labeling index and Ki67 mRNA. Interestingly, Cx26 could be observed at the junctional membrane of Ki67-positive cells, Ki67-negative cells and between Ki67-positive and Ki67negative cells. This observation suggests that Cx26 is present in different populations of HAECs (Ki67-negative and Ki67-positive) or that co-expression of both proteins in one cell population is transient. Given that one dividing BC can give rise to two daughters BCs, or one BC and one early progenitor cell (EP) or two EPs, and that these processes of symmetric and asymmetric division behave in a stochastic manner (Teixeira et al., 2013), it was impossible to detect the sequential expression of these two proteins as a function of time of repair in a 3D culture model of primary HAECs.

There is a body of evidence implicating gap junctions as growth suppressors in several tissues but a direct connection between the exchange of signaling molecules between cells through gap junctions and the control of cell proliferation has not been estab-lished (Kardami et al., 2007). Using sophisticated techniques, it was recently reported that Cx26 redistributes cAMP between cancer cells that, in turn, blocks cell division (Chandrasekhar et al., 2013). Such a mechanism may also explain how exogenous expression of Cx26 improved barrier function and maintained tight junctions in Calu-3 airway epithelial cells (Go et al., 2006). Indeed, Cx26 expression may decrease proliferation in this cell



S. Crespin et al. / The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 52 (2014) 152–160

Fig. 6. (a) The Ki67-labeling index (%) was determined in the front and back areas of CF HAECs undergoing repair for different times post-wounding. Of note, Ki67 detection between front and back areas was not significantly different; n = 4. (b) Quantification of the Cx26 signal (integrated area) in the front and back areas of CF HAECs undergoing repair for different times post-wounding. Again, no significant difference in Cx26 expression between front and back areas was observed. n = 6, (c) Time course of wound closure measured in CF HAECs (n = 5) undergoing repair after wounding. The time course of wound closure from Ctrl HAECs (gray line) is redrawn from Fig. 1c for comparison purposes; P < 0.015. (d) RT-qPCR for Sox2 mRNA obtained from control (Ctrl) and CF HAECs, n = 5 (Ctrl HAECs), respectively. (e) RT-qPCR for Nanog mRNA obtained from control (Ctrl) and CF HAECs, n = 9 (Ctrl HAECs) and 6 (CF HAECs), respectively. (f) RT-qPCR for OCT3/4 mRNA obtained from control (Ctrl) and CF HAECs, n = 10 (Ctrl HAECs) and 5 (CF HAECs), respectively. In (d)–(f), values were calculated as $2^{-\Delta CT}$.

line, thus favoring cell–cell contacts and the establishment of a tight epithelium. In this context, the tight junction associated protein occludin was shown to bind Cx26 *via* coiled–coil domain interaction (Nursat et al., 2000). Thus, induction of Cx26-mediated intercellular communication by proliferative signals in repairing BCs may represent a mean to repress their proliferation and progressively promote the formation of a tight monolayer, which may serve as a platform for later differentiation. The signaling factors that regulate the on/off expression of Cx26 during the repair process remained to be identified.

An inverse relationship between KLF4 and Cx26 expression has been observed in keratinocytes from *klf4*-deficient mice. It was suggested that persistent expression of Cx26 in suprabasal cells, by virtue of the involucrin promoter, maintained the epidermis in a hyper-proliferative state (Djalilian et al., 2006), suggesting that Cx26 stimulated proliferation. This scenario was not supported in a recent study reporting that ectopic expression of Cx26 in basal keratinocytes using the CK5 promoter showed a tendency to decrease proliferation but had no pathological skin alteration as compared to control mice (Wang et al., 2010). We found in HAECs that silencing Cx26 markedly decreased mRNA levels of KLF4 while down-regulation of KLF4 had no effects on Cx26 mRNA. Thus, induction of Cx26 in repairing HAECs is likely the consequence of increased proliferation rather than inhibition of transcriptional repression by KLF4. KLF4 levels are generally elevated in differentiated tissues as compared to proliferating and cancer cells (McConnell and Yang, 2010). As expected, KLF4 mRNA was 10 times lower in proliferating HAECs as compared to well-differentiated cultures. Therefore, it cannot be ruled out that the decreased KLF4 transcription observed during Cx26 gene silencing is an indirect consequence of enhanced proliferation.

Cx26 and KLF4 are both key factors in the balance between proliferation and differentiation and we hypothesized that alteration in this coordinated process may result in abnormal repair and remodeling of HAECs, as observed in many respiratory diseases. We have found that the transcriptional activity of *klf2* and *klf4* genes is induced transiently in response to wounding, a phenomenon that was absent in CF HAECs. In CF cultures, however, we observed prompt induction of proliferation and of Cx26 expression at the early phases of wound repair, as well as enhanced initial rate of wound closure as compared to Ctrl HAECs. These results may relate to the hyper-proliferative state previously described in CF HAECs (Voynow et al., 2005; Hajj et al., 2007). The rapid onset of proliferation in CF HAECs could be explained, in part, by increased amount of progenitor cells in these cultures. This did not appear to be the case since no difference was detected in mRNAs of KLF4,

Nanog, and OCT3/4 between control and CF HAECs. Thus, our results suggest that the balance between pro-and anti-proliferative signals is altered in repairing CF HAECs.

Recent data have reported the critical role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*Cftr*) gene in airway epithelial wound healing (Schiller et al., 2010; Trinh et al., 2012). Although the mechanisms connecting *Cftr* deficiency to defective *klf4* induction and enhanced HAEC activation remain to be established, our results point to a disturbed repair process of CF HAECs characterized by fast but desynchronized initiation of BC activation and proliferation in a primary 3D model of epithelium damage.

Acknowledgements

This work was supported by the Swiss National Science Foundation (grants 310000_119739 and 310030_134907/1) to M.C. S.C was supported by "Vaincre la Mucoviscidose", "Téléthon Action Suisse" and "Novartis Stiftung für Medizinisch Biologische Forschung". We are indebted to Dr. SH Randell (Cystic Fibrosis/Pulmonary Research and Treatment Center, The University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA) for providing us with the UNCN airway cell lines. We thank Isabelle Scerri and Davide Losa for technical help and discussion during the progression of this project.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel. 2014.02.010.

References

- Beers MF, Morrissey EE. The three R's of lung health and disease: repair, remodelling, and regeneration. J Clin Invest 2011;121:2065–73.
- Borthwick DW, Shahbazian M, Krantz QT, Dorin JR, Randell SH. Evidence for stemcell niches in the tracheal epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 2001;24:662–70. Carson JL, Reed W, Moats-Staats BM, Brighton LE, Gambling TM, Hu SC, et al. Conconstruction in the ward of provide intervenue of the sector of the sector.
- nexin26 expression in human and ferret airways and lung during development. Am J Respir Cell Mol Biol 1998;18:111–9. Chandrasekhar A, Kalmykov EA, Polusani SR, Mathis SA, Zucker SN, Nicholson BJ. Intercellular redistribution of cAMP underlies selective suppression of cancer
- Intercellular redistribution of cAMP underlies selective suppression of cancer cell growth by Connexin26. PLoS ONE 2013;8:e82335.
- Chanson M, Koval M. Connexins in lung function and inflammation. In: Oviedo-Orta E, Kwak BR, editors. Connexin Cell Communication Channels: Roles in the Immune System & Immunopathology. WH Evans–CRC Press; 2013. p. 137–56. Choudhry R, Pitts JD, Hodgins MB. Changing patterns of gap junctional intercellular
- Choudhry R, Pitts JD, Hodgins MB, Changing patterns of gap junctional intercellular communication and connexin distribution in mouse epidermis and hair follicles during embryonic development. Dev Dyn 1997;210:417–30.
- Cowan CE, Kohler EE, Dugan TA, Mirza MK, Malik AB, Wary KK. Kruppel-like factor-4 transcriptionally regulates VE-cadherin expression and endothelial barrier function. Circ Res 2010:959–66, 107.
- Djalilian AR, McGaughey D, Patel S, Seo EY, Yang C, Cheng J, et al. Connexin26 regulates epidermal barrier and wound remodelling and promotes psoriasiform response. J Clin Invest 2006;116:1243–53.
- Fulcher ML, Gabriel SE, Olsen JC, Tatreau JR, Gentzsch M, Livanos E, et al. Novel human bronchial epithelial cell lines for cystic fibrosis research. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2009;296;L82–91.
- Go M, Kojima T, Takano K, et al. Connexin 26 expression prevents downregulation of barrier and fence functions of tight junctions by Na^+/K^* -ATPase inhibitor ouabain in human airway epithelial cell line Calu-3. Exp Cell Res 2006;312:3847–56.

- Goliger JA, Paul DL. Expression of gap junction proteins Cx36, Cx31. 1, Cx37 and Cx43 in developing and mature rat epidermis. Dev Dyn 1994;200;1–13.
- Ghosh M, Brechbuhl HM, Smith RW, Li B, Hicks DA, Titchner T, et al. Contextdependent differentiation of multipotential keratin14-expressing tracheal basal cells. Am J Respir Cell Mol Biol 2010;45:403–10.
- Hackett T-L, Shaheen F, Johnson A, Wadsworth S, Pechkovsky DV, Jacoby DB, et al. Characterization of side population cells from human airway epithelium. Stem cCells 2008:26:2576–85.
- Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. J Pathol 2007;211:340–50.
- Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. In vivo differentiation potential of tracheal basal cells evidence for multipotent and unipotent subpopulations. Am J Physiol Cell Mol Physiol 2004;286:L643–9.
- Kardami E, Danga X, Iacobas DA, Nickel BE, Jeyaraman M, Srisakuldee W, et al. The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. Prog Biophys Mol Biol 2007;94:245–64
- Kumar PA, Hu Y, Yamamoto Y, Hoe NB, Wei TS, Mu D, et al. Distal airway stem cells yield alveoli in vitro and during lung regeneration following H1N1 influenza infection. Cell 2011;147:525–38.
- Laird DW. The gap junction proteome and its relationship to disease. Trends Cell Biol 2010;20:92–101.
- Lim PK, Bliss SA, Patel SA, Taborga M, Dave MA, Gregory LA, et al. Gap junctionmediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can eleicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. Cancer Res 2011;71:1550–60.
- McConnell BB, Yang WW, Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. Physiol Rev 2010;90:1337–81.
- McQualter JL, Bertoncello I. Concise review deconstructing the lung to reveal its regenerative potential stem cells. Stem Cells 2012., http://dx.doi.org/10.1002/stem.1055.
- Nursat A, Chen JA, Foley CS, Liang TW, Tom J, Cromwell M, et al. The coiled-coil domain of occludin cana ct to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. J Biol Chem 2000;275:29816–22.
- Randell SH. Airway epithelial stem cells and the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc 2006;3:718–25.
- Rock JR, Gao X, Xue Y, Randell SH, Kong YY, Hogan BL. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. Cell Stem Cell 2011;8:639–48.
- Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106;12771–5.
- Segre J-A, Bauer C, Fuchs E. KI[4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. Nat Genet 1999;22:356–60.
- Schiller KR, Maniak PJ, O'Grady SM. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair. Am J Physiol Cell Physiol 2010;299:C912–21.
- Teixeira VH, Nadarajan P, Graham TA, Teixeira VH, Nadarajan P, Graham TA, et al. Stochastic homeostasis in human airway epithelium is achieved by neutral competition of basal cell progenitors. eLife 2013;2:e00966.
- Trinh NT, Bardou O, Privé A, Maillé E, Adam D, Lingée S, et al. Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. Eur Respir J 2012;40:1390–400.
- Vinken M, Decrock E, De Vuyst E, Ponsaerts R, D'hondt C, Bultynck G, et al. Connexins: sensors and regulators of cell cycling. Biochim Biophys Acta 2011;1815:13–25.
 Voynow JA, Fischer BM, Roberts BC, Proia AD. Basal-like cells constitute the pro-
- Voynow JA, Fischer BM, Roberts BC, Proia AD. Basal-like cells constitute the proliferating cell population in cystic fibrosis airways. Am J Respir Crit Care Med 2005;172:1013–8.
- Wang X, Ramurez A, Budunova I, Overexpression of Connexin26 in the basal keratinocytes reduces sensitivity to tumor promoter TPA. Exp Dermatol 2010;19:633–40.
- Wani MA, Wert SE, Lingrel JB. Lung Kruppel-like factor, a zinc finger transcription factor, is essential for normal lung development. J Biol Chem 1999;274:21180–5.
 Wansleeben C, Barkauskas CE, Rock JR, Hogan BLM. Stem Cells of the adult lung:
- Wansleeben C, Barkauskas CE, Rock JR, Hogan BLM. Stem Cells of the adult lung: their development and role in homeostasis, regeneration and disease. WIREs Dev Biol 2013;2:131–48.
- Wiszniewski L, Jornot L, Dudez T, Pagano A, Rochat T, Lacroix JS, et al. Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from CF patients. Am J Respir Cell Mol Biol 2006;34:39–48.
- Wiszniewski I, Sanz J, Scerri I, Gasparotto E, Dudet T, Lacroix JS, et al. Functional expression of connexin30 and connexin31 in the polarized human airway epithelium. Differentiation 2007;75:382–92.





Thèse de Doctorat

Jessica BELLEC

Stratégies d'invalidation du gène *CFTR* dans les cellules épithéliales respiratoires humaines pour la mise au point d'un nouveau modèle de la mucoviscidose

Approaches to invalidate *CFTR* gene in human airway epithelial cells to generate a new model for cystic fibrosis

Résumé

La mucoviscidose (CF) est une maladie autosomale récessive rare causée par des mutations du gène *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). L'atteinte respiratoire caractérisée par une infection chronique et une inflammation délétère reste la cause majeure de mortalité chez les patients. L'étude de modèles cellulaires et animaux CF a permis la compréhension des mécanismes sous-jacents bien que plusieurs questions concernant la composante *CFTR*-spécifique de l'inflammation et de la réparation du tissu pulmonaire restent en suspens.

Afin de proposer de nouveaux modèles cellulaires de la mucoviscidose, deux stratégies d'invalidation du gène CFTR dans des cellules épithéliales respiratoires humaines ont été comparées. L'expression stable de séquences ARN interférentes (shRNA) et du système CRISPR-Cas9 grâce à aux vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1, a permis une diminution de l'expression protéique dans la lignée glandulaire Calu-3. Seule la stratégie CRISPR-Cas9 a permis l'obtention d'un défaut du canal CFTR caractéristique de la mucoviscidose. Les propriétés de migration et de prolifération de cette nouvelle lignée CF ne sont pas altérées, mais une augmentation de la production basale de la cytokine pro-inflammatoire interleukine-8 a été observée. Appliqué aux cellules épithéliales respiratoires primaires, l'outil CRISPR-Cas9 a permis une inhibition du gène CFTR au niveau fonctionnel, démontrant son potentiel d'édition du gène CFTR dans ce type de culture.

La caractérisation de ces nouveaux modèles cellulaires de la mucoviscidose et de leurs contrôles isogéniques devrait ainsi apporter un éclairage nouveau sur certains mécanismes encore controversés.

Mots clés

Mucoviscidose, *CFTR*, invalidation de gène, interférence ARN, CRISPR-Cas9, vecteurs lentiviraux, cellules primaires.

Abstract

Cystic fibrosis is a rare autosomal recessive disorder caused by mutations in the *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) gene. Pulmonary disease remains the major cause of death in CF patients and is characterized by chronic infection and deleterious inflammation. Understanding of the underlying mechanisms benefited from the study of CF cell and animal models. However, several hypotheses concerning the contribution of mutated CFTR channel in inflammation and epithelial repair remain unanswered.

In order to generate new CF cell models, we compared two strategies for *CFTR* invalidation in human airway epithelial cells (HAECs). Stable expression of interfering RNA sequences (shRNA) and CRISPR-Cas9 system using HIV-1-derived lentiviral vectors decreased CFTR protein expression in the submucosal Calu-3 cell line. *CFTR* knockdown at the functional level characteristic of *CFTR* defect was confirmed in the CRISPR-Cas9 Calu-3 cell line only. *CFTR* invalidation did not affect cell migration and proliferation but basal secretion of the pro-inflammatory interleukin-8 was increased. Stable expression of CRISPR-Cas9 system in primary HAECs induced *CFTR* inhibition at the functional level and confirmed its potential for CFTR gene editing in these cultures.

Characterization of these new CF cell models with their isogenic controls should give a new insight on controversial mechanisms.

Key Words

Cystic fibrosis, *CFTR*, gene invalidation, RNA interference, CRISPR-Cas9, lentiviral vectors, primary cells.