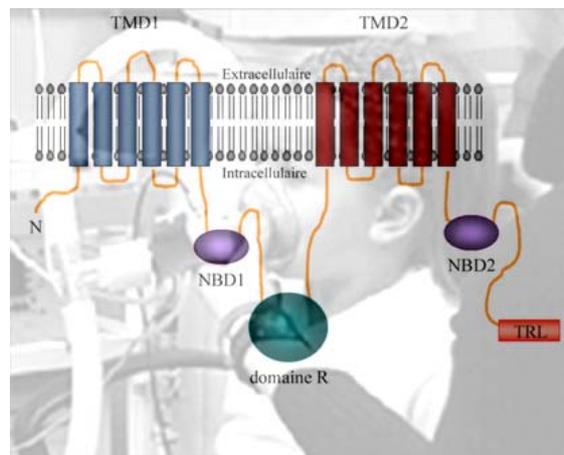


Etude des mécanismes moléculaires responsables d'un état inflammatoire intrinsèque dans la mucoviscidose



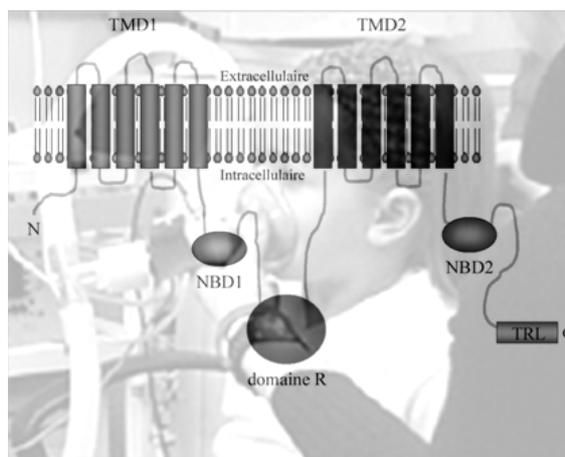
Catherine Verhaeghe



Thèse présentée en vue de l'obtention du
grade de Docteur en Sciences

Année Académique 2006-2007

**Etude des mécanismes moléculaires responsables
d'un état inflammatoire intrinsèque dans la
mucoviscidose**



Catherine Verhaeghe

Au terme de ce travail, je voudrais remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont permis de mener à bien cette thèse de doctorat.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Vincent Bours qui m'a accueillie au sein de son laboratoire, m'a accordé sa confiance et m'a donné l'opportunité de travailler sur un sujet qui me tenait à cœur. Vincent, malgré ton emploi du temps surchargé, tu as toujours répondu présent lorsque j'avais des doutes ou besoin de conseils. Je te suis très reconnaissante de tout ce que tu as fait pour moi durant ces cinq années de doctorat.

Je souhaiterais remercier très chaleureusement le Dr Cécile Oury pour m'avoir soutenue et encouragée durant ces années. Cécile, je te remercie pour ta disponibilité et tes nombreux conseils.

Mes remerciements vont également au Dr Katty Delbecq, au Dr Laurence de Leval, au Dr Benoît Hennuy, au Dr Alain Vanderplasschen et au Dr Marianne Fillet qui ont grandement contribué à la réalisation de ce travail.

Je remercie le Dr Alain Chariot pour ses conseils judicieux ainsi que le Dr Marie-Paule Merville pour ses commentaires pertinents exprimés lors de nos réunions hebdomadaires.

Tous mes remerciements vont également à l'équipe de Génétique Humaine et de Chimie Médicale, mes compagnons de fortune, qui grâce à leur soutien et leurs encouragements m'ont permis d'atteindre la ligne d'arrivée. Un Merci tout particulier à Anne-Françoise qui a toujours été franche avec moi et su trouver les mots justes. Je tiens à remercier également Gaël pour sa bonne humeur et son optimisme au quotidien. A vous deux Merci.

Je voudrais remercier le Professeur Jacques Piette pour ses nombreux conseils et ses encouragements durant ces cinq ans ainsi que les membres du laboratoire de virologie pour leur enthousiasme inébranlable.

Un tout grand Merci à Marianne Fertons pour son efficacité sans faille, sa gentillesse et sa disponibilité. Marianne, tu es une perle rare !

Il va de soi que je remercie mes parents pour m'avoir donné ma chance à l'université et de m'avoir appris à ne jamais baisser les bras, même dans l'adversité. Si j'en suis là, c'est grâce à vous... Je remercie également mes beaux-parents pour leur soutien durant toutes ses années.

Je termine en remerciant les deux personnes qui me sont les plus chères, mon mari Sébastien et mon fils Arthur. Séba, je te remercie pour ta patience, ton écoute et tes encouragements au quotidien. Merci de m'avoir pardonné mes absences, mes irritabilités et mes coups de déprime. Je te remercie aussi de m'avoir redonné courage et confiance quand j'étais au bout du rouleau. Arthur, du haut de tes 2 ans, tu comprends déjà beaucoup de choses mais pas encore pourquoi ta maman préfère « jouer » à l'ordinateur plutôt que d'aller à la plaine de jeux avec toi. Un jour, quand tu seras grand, tu comprendras !

Ce travail a reçu le soutien financier des organismes belges suivants :

Le Fond pour la Recherche Industrielle et Agricole (F.R.I.A.)

La Fondation Léon Frédéricq

La Fondation Forton

Abréviations

ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
AQP	<i>Aquaporin</i>
CBAVD	<i>Congenital bilateral absence of vas deferens</i>
CF	<i>Cystic Fibrosis</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
Δ F508	<i>Deletion of a Phenylalanine at the position 508</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ENaC	<i>Epithelial Sodium Channel</i>
ERK	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i>
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
G-CSF	<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
Gro	<i>Growth Regulated Oncogene</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule-1</i>
IKK	<i>IκB Kinase</i>
I κ B	<i>Inhibitor of κB</i>
IL-	<i>Interleukin</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MMP	<i>Membrane Metalloproteinase</i>
NBD	<i>Nucleotide Binding Domain</i>
NEMO	<i>NF-κB Essential Modulator</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor κB</i>
NHERF	<i>Sodium-Proton Exchange Regulatory Factor</i>
PAF	<i>Platelet Activator Factor</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PKA	<i>Protein Kinase A</i>
PLGF	<i>Placental like Growth Factor</i>
TGF	<i>Tumor Growth Factor</i>
TMD	<i>TransMembrane Domain</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

INTRODUCTION	1
1. La mucoviscidose	1
1.1. Introduction générale	1
1.2. Diagnostic et dépistage	2
1.3. La pathophysiologie	6
1.4. La mucoviscidose « non-classique » ou « atypique »	8
1.5. Le gène Cftr	8
1.5.1. Clonage et caractérisation du gène Cftr	8
1.5.2. La protéine CFTR	9
1.5.3. Les mutations dans le gène CFTR	15
1.5.4. La relation entre le génotype et le phénotype	16
2. L'inflammation	19
2.1. Généralité	19
2.1.1. La réponse inflammatoire	19
2.1.2. Les médiateurs chimiques	20
2.1.3. Le remodelage de la matrice	22
2.2. Impact de la mutation $\Delta F508$ sur la réaction inflammatoire	23
2.2.1. La genèse des symptômes pulmonaires	23
2.2.2. Le lien entre CFTR et la persistance des infections	24
2.2.3. L'inflammation précoce	27
2.2.4. Rôle des neutrophiles dans la mucoviscidose	28
3. Les facteurs de transcription	31
3.1. NF- κ B	31
3.1.1. La famille NF- κ B	31
3.1.2. La famille I κ B	32
3.1.3. Voies d'activation de NF- κ B	32
3.1.4. Gènes cibles de NF- κ B	34
3.1.5. NF- κ B et l'inflammation	35
3.1.6. Les inhibiteurs de NF- κ B	35
3.2. AP-1	37
3.2.1. La famille AP-1	37
3.2.2. Régulation de l'activité de AP-1	37

3.2.3. <i>Gènes cibles de AP-1</i>	40
3.2.4. <i>AP-1 et l'inflammation</i>	41
OBJECTIFS DU TRAVAIL	43
RESULTATS	47
1. Article N°1	49
1.1. Contexte	49
1.2. Résultats	49
1.3. Conclusion	50
2. Article N°2:	53
2.1. Contexte	53
2.2. Résultats	54
2.3. Conclusion	56
3. Article N°3:	57
3.1. Contexte	57
3.2. Résultats	58
3.3. Conclusion	60
DISCUSSION	61
1. L'inflammation... Avant ou après infections	63
2. Rôle du stress du réticulum endoplasmique dans la réponse inflammatoire	66
3. CFTR et la réaction inflammatoire	67
3.1. CFTR comme régulateur négatif de la réaction inflammatoire	67
3.2. CFTR- Δ F508 comme activateur de la réaction inflammatoire	68
4. Rôle de l'angiogenèse dans la mucoviscidose	71
5. NF-κB et AP-1 comme cible thérapeutique ?	72
6. Perspectives	74
RESULTATS PRELIMINAIRES	77
BIBLIOGRAPHIE	79

INTRODUCTION

1. La mucoviscidose

1.1. Introduction générale

La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive létale. Grâce aux outils de la génétique moderne, nous savons que la mucoviscidose est apparue il y a plus de 2625 générations, ce qui représente environ 50 000 ans (Dawson and Frossard, 2000). Toutefois, son existence dans la population caucasienne n'a été mise en évidence que tout récemment. La première description clinique de la mucoviscidose, donnée par Andersen, n'apparaît qu'en 1938 (Andersen, 1938). Cette pathologie est appelée fibrose kystique (*cystic fibrosis*) du pancréas pour la distinguer des autres maladies chroniques causées par une mauvaise absorption gastro-intestinale. Elle est également connue sous le terme de « mucoviscidose » suite à la découverte, chez les patients atteints par cette maladie, d'une quantité importante de mucus épais dans un grand nombre d'organes. C'est au cours de la vague de chaleur de 1948 à New York que le pédiatre Paul di Sant'Agnesse découvrit que la plupart des enfants victimes d'une insolation souffraient de la mucoviscidose. Il a postulé dès lors que la composition de leur sueur était anormale et il est parvenu à démontrer, quelques années plus tard, que les patients atteints de mucoviscidose présentaient un excès de sodium et de chlore dans leur sueur, allant jusqu'à une concentration cinq fois plus importante que celle présente dans la sueur de personnes saines (Di Sant'Agnesse et al., 1953). En 1949, sur base de l'héritage autosomique récessif de cette pathologie, Lowe et ses collaborateurs ont postulé que la mucoviscidose devait être causée par un seul gène défectueux (Lowe et al., 1949). En 1983, des études menées sur des conduits sudoripares ont permis à Paul Quinton d'identifier un transporteur au chlore comme étant à la base de la pathologie (Quinton, 1983). Le clonage du gène *Cfr* en 1989 et la découverte des différentes mutations de ce gène ont confirmé l'hypothèse monogénique de cette maladie. De même, ces études ont identifié CFTR comme un transporteur au chlore, confirmant ainsi l'hypothèse de Quinton (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989). L'année 1992 voit apparaître les premiers essais de réintroduction du gène *Cfr* sauvage dans l'épithélium respiratoire ou dans celui des glandes sudoripares (Figure 1).

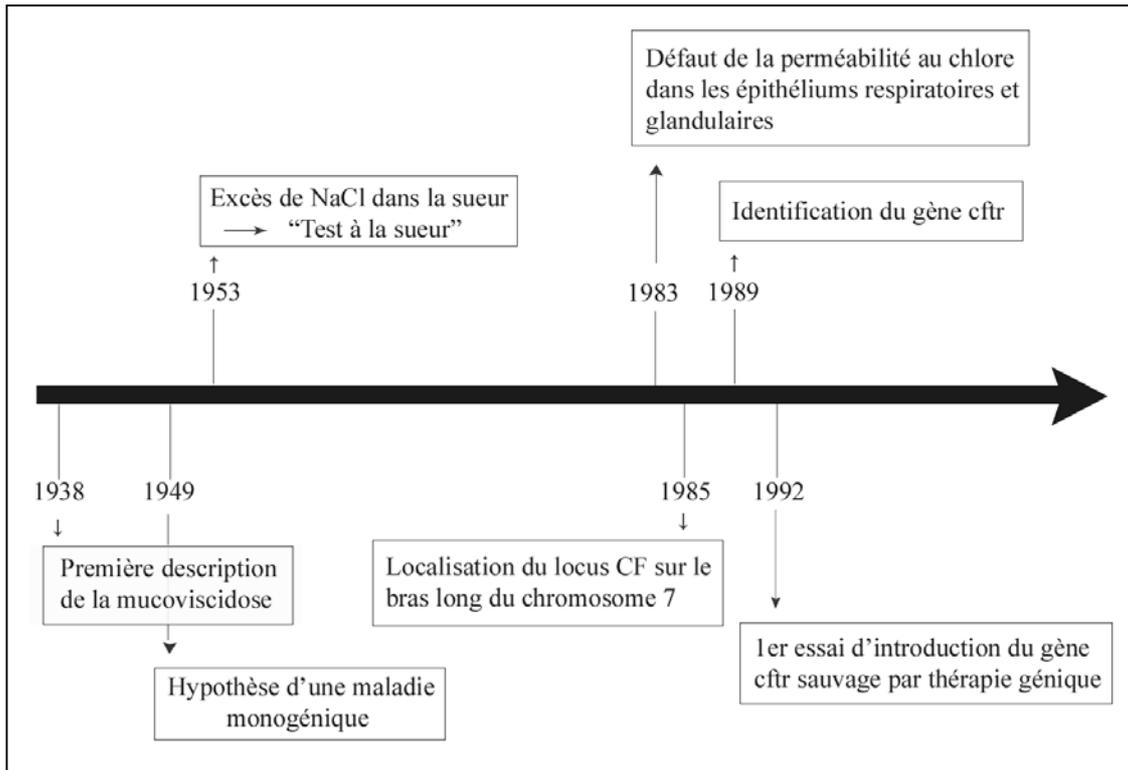


Figure 1 : Evènements marquants dans le diagnostic, la description clinique et les thérapies de la mucoviscidose.

Actuellement, la mucoviscidose est classiquement décrite comme une maladie pulmonaire obstructive chronique accompagnée d'une insuffisance pancréatique exocrine et d'une élévation de la concentration en sodium et en chlore dans la sueur. Ces symptômes trouvent leur origine dans un transport anormal du chlore causé par le dysfonctionnement du canal transmembranaire CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*). L'altération des mouvements ioniques et hydriques au niveau des différents épithélia joue un rôle important dans la composition des sécrétions conduisant à un mucus déshydraté et épais. Ce mucus affecte l'appareil mucociliaire et le système digestif conduisant à l'inflammation et à la destruction des poumons ainsi que du pancréas (Rowe et al., 2005).

1.2. Diagnostic et dépistage

La mucoviscidose est une des maladies génétiques létales la plus répandue dans la population caucasienne. Cette maladie se transmet suivant un mode récessif avec une incidence d'environ 1 nouveau-né sur 2500 dans l'ouest de l'Europe et aux Etats-Unis. L'espérance de vie de ces patients ne cesse de croître grâce à de nouvelles thérapies, au

dépistage précoce et à la mise en place de centres spécialisés. Sur base de données statistiques, l'espérance de vie des enfants nés à partir de 1990 est estimée à 40 ans, alors qu'en 1970, 50 % des patients ne dépassaient pas l'âge de 14 ans.

Le dépistage précoce de la mucoviscidose permet de commencer rapidement un traitement approprié afin d'éviter l'apparition de lésions irréversibles. Cette prise en charge précoce et spécialisée est un facteur essentiel susceptible d'augmenter considérablement la qualité et l'espérance de vie des patients. Jusqu'en 1990, le diagnostic de la mucoviscidose était basé principalement sur la mesure du chlore dans la sueur et sur les caractéristiques cliniques telles que des problèmes respiratoires récurrents, un iléus méconial, un retard statur pondéral et des diarrhées graisseuses (Gibson et al., 2003). Suite à l'identification du gène *Cftr* en 1989, les tests génétiques ont vu le jour et ont permis de confirmer les suspicions de mucoviscidose ainsi que d'identifier les mutations responsables de la maladie.

Le test à la sueur permet de déterminer la teneur en sodium et en chlore de la sueur qui, chez les patients atteints de mucoviscidose, est supérieure à la normale. La méthode utilisée est celle décrite par Gibson et Cooke et consiste en une iontophorèse à la pilocarpine (Gibson and Cooke, 1959). La sudation est provoquée en faisant passer pendant quelques minutes un courant de très faible intensité au travers d'une compresse imprégnée de pilocarpine, molécule aux propriétés cholinergiques. A l'état normal, la concentration en chlore ne dépasse pas les 40 mmol/l alors qu'elle est supérieure à 60 mmol/l chez les patients atteints de mucoviscidose. Bien que le test à la sueur soit considéré comme fiable, 2% des patients présentent un test à la sueur normal alors qu'ils sont atteints de la mucoviscidose (mucoviscidose atypique). Pour ces patients, des tests complémentaires sont réalisés tels qu'une analyse génétique ou une analyse de différence de potentiel nasal. Cette dernière technique permet de mesurer le courant généré par les mouvements ioniques au travers de l'épithélium nasal. La généralisation de cette méthode, plus sensible que le test à la sueur, permettrait d'identifier certains patients atteints de mucoviscidose et ayant un test à la sueur normal ou intermédiaire (Davies, 2006; Davis, 2006; De Boeck et al., 2006).

A l'heure actuelle, les futurs parents, ayant un membre de leur famille atteint de mucoviscidose, ont la possibilité de faire un test génétique pré-conceptionnellement afin de déterminer s'ils sont porteurs ou non de cette même mutation (Davies, 2006; Davis, 2006). Pour les parents n'ayant aucun antécédent familial, les gynécologues proposent, mais pas systématiquement, une analyse génétique des mutations les plus fréquentes pour la mère afin de déterminer si elle présente une mutation du gène *Cftr*. Dans le cas où l'analyse génétique est positive, le test est alors réalisé chez le futur père pour évaluer les risques d'avoir un

enfant atteint de mucoviscidose. Pour les parents qui n'ont pas pu bénéficier du test génétique, un dépistage néonatal de la mucoviscidose est prévu dans un grand nombre de maternités.

Le dépistage de la mucoviscidose chez un nouveau-né se fait généralement sur une goutte de sang séché prélevée cinq jours après la naissance. Les enfants atteints de mucoviscidose présentent, dans 90 % des cas, un taux élevé de trypsine immunoréactive (Parad and Comeau, 2005; Sermet-Gaudelus et al., 2006). Cette enzyme, produite par le pancréas, est déversée dans les intestins au moment des repas. Chez les patients mucoviscidosiques, la trypsine s'infiltré dans la circulation sanguine suite à l'obstruction des canaux pancréatiques par le mucus visqueux. Pour les tests se révélant positifs, deux approches sont possibles et varient selon les maternités. Un test génétique peut être réalisé à partir du même prélèvement ou un deuxième prélèvement est effectué deux à quatre semaines plus tard afin de confirmer l'élévation persistante de trypsine immunoréactive dans le sang (Southern et al., 2007). Ce deuxième test est systématiquement suivi d'un test à la sueur.

Le test génétique est proposé afin de confirmer la suspicion de mucoviscidose après un taux élevé de trypsine immunoréactive ou en cas de signes cliniques évocateurs. Ce test génétique permet de détecter les mutations les plus répandues grâce à la disponibilité de plusieurs tests commerciaux : le test *INNO-LiPA CFTR* (Innogenetics), le test *OLA Cystic Fibrosis* (laboratoires Abbott) et le test *Elucigene CF* (Tepnel Diagnostics). La plupart de ces tests détectent les 30 mutations les plus fréquemment rencontrées dans la population caucasienne, conduisant à un dépistage de plus de 90 % des mutations. Ces tests génétiques présentent tout de même un désavantage en cas de mutations rares non détectables par les tests génétiques proposés. En effet, dans ces cas-là, les tests ne permettent pas toujours de discriminer une personne mucoviscidosique d'une personne hétérozygote. (Parsons et al., 2003; Comeau et al., 2004; Castellani et al., 2005). A ce jour, plus de 1500 mutations ont été rapportées (www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html) rendant le diagnostic génétique de plus en plus compliqué et augmentant ainsi le risque de ne pas déceler une mutation rare. Seul le séquençage du gène *Cfr* permet d'atteindre une sensibilité de 100 %. Toutefois, le lien entre la découverte d'une mutation et son implication dans la maladie n'est pas toujours clair. En effet, les conséquences fonctionnelles d'un grand nombre de mutations ne sont, à ce jour, pas encore connues (Davies, 2006; Davis, 2006; De Boeck et al., 2006). Le diagramme suivant reprend différentes situations rencontrées lors du dépistage de la mucoviscidose et les conclusions qui en découlent (Figure 2).

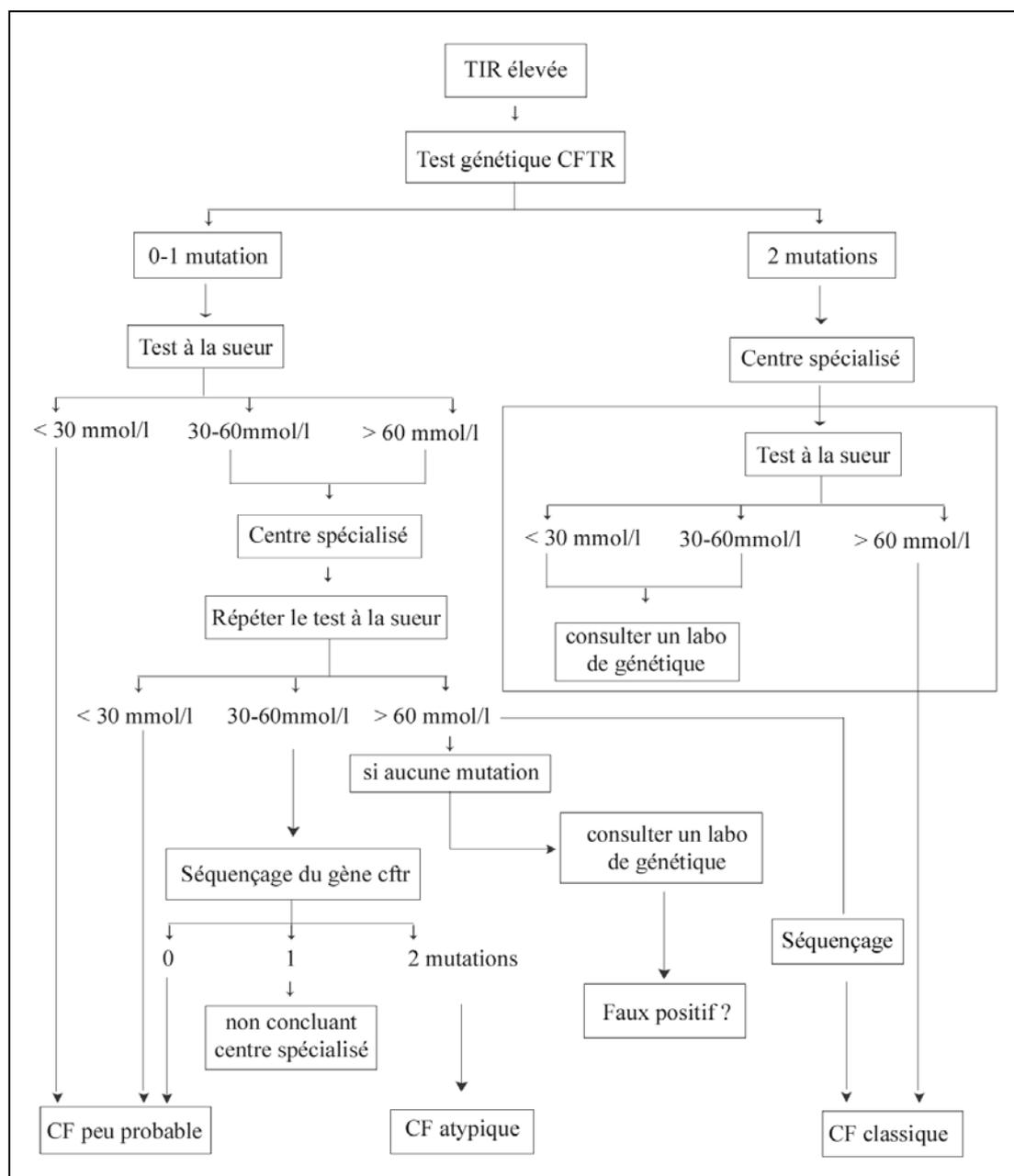


Figure 2 : Diagramme reprenant les différents tests de dépistage de la mucoviscidose afin de déterminer si un patient est atteint de mucoviscidose classique ou non-classique.

Dans le cas où le test génétique ne révèle aucune voire une mutation avec un test à la sueur inférieur à 60 mmol/l, il est peu probable que le patient soit atteint de mucoviscidose. Cependant, la probabilité d'être porteur est élevée. Il est également conseillé de faire des tests complémentaires afin d'écarter tout risque de maladies telles qu'une immunodéficience humorale, un syndrome de Shwachman ou une dyskinésie ciliaire primaire. TIR, trypsine immunoréactive ; CF, mucoviscidose.

1.3. La pathophysiologie

La mucoviscidose mène à des changements pathologiques dans les différents organes exprimant la protéine CFTR, ceux-ci incluant les glandes sudoripares, les sinus, les poumons, le pancréas, le foie, les intestins et les voies génitales (Figure 3). Toutefois, les modifications les plus importantes impliquent les voies respiratoires où le dysfonctionnement du canal CFTR cause des infections pulmonaires chroniques (Ratjen and Doring, 2003).

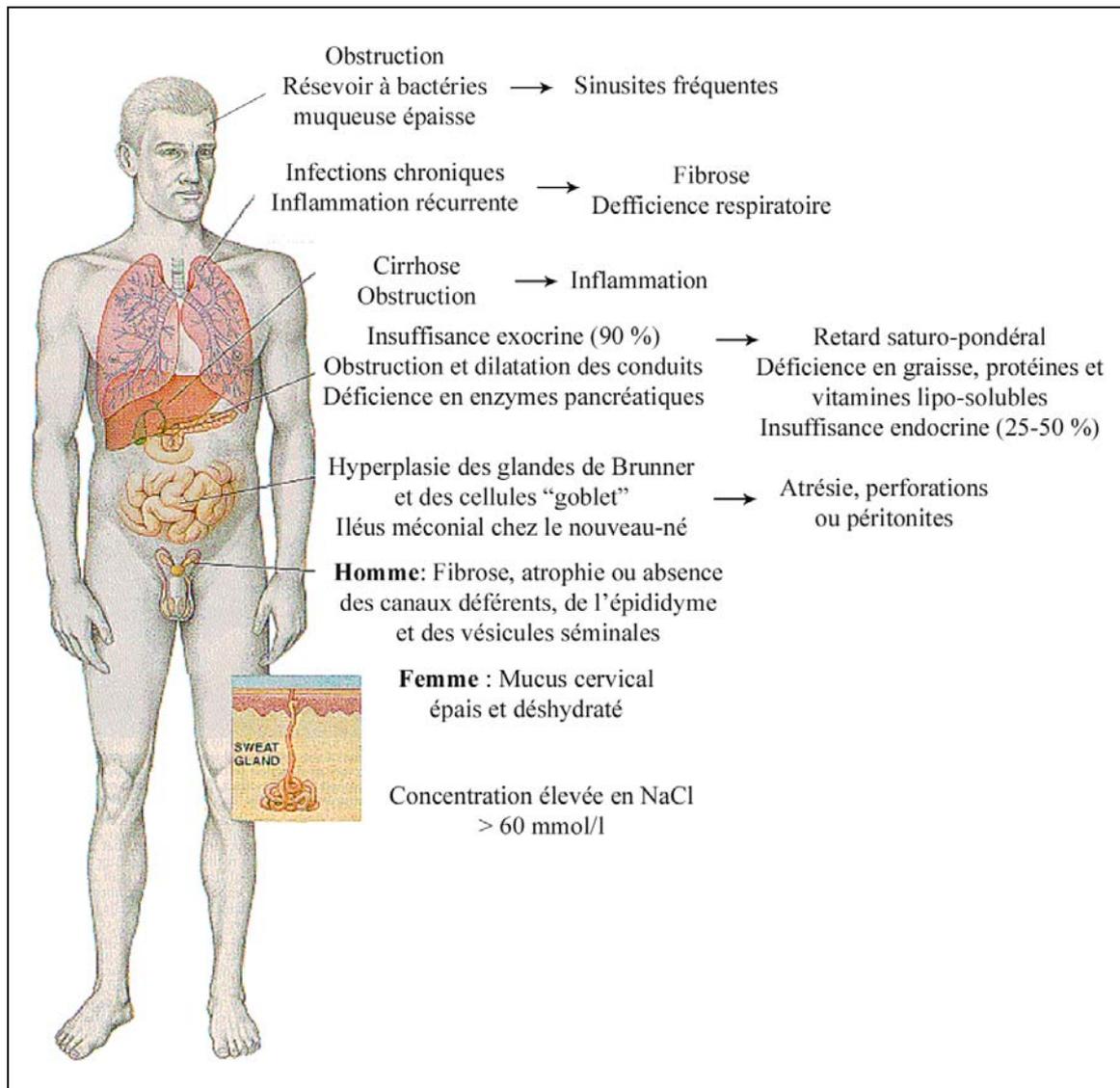


Figure 3 : Organes affectés par la mucoviscidose.

Les voies respiratoires :

- Première cause de morbidité et de mortalité.
- Obstruction des voies respiratoires suite aux sécrétions anormales de mucus visqueux.
- Episodes récurrents d'infections et d'inflammation conduisant à la destruction du tissu pulmonaire, à la fibrose et finalement à la détresse respiratoire (Gibson et al., 2003; Davis, 2006).
- Avant l'âge d'un an, présence d'interleukine-8 (IL-8), de neutrophiles et de microorganismes dans les lavages broncho-alvéolaires (Balough et al., 1995; Khan et al., 1995; Armstrong et al., 1997; Armstrong et al., 2005). *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont les pathogènes les plus fréquemment rencontrés.
- La colonisation chronique par *P. aeruginosa* est associée à un déclin beaucoup plus rapide des fonctions respiratoires entraînant une diminution de l'espérance de vie de façon drastique (Starner and McCray, 2005).

Le système hépatobiliaire :

- Deuxième cause de mortalité
- Cirrhose du foie dans 25 % des cas. Cependant, les signes cliniques de problèmes hépatiques ne sont diagnostiqués que chez 2 à 3 % des enfants et chez 5 % des adultes.
- Les sécrétions de mucus conduisent à une hyperprolifération, une inflammation et une obstruction intra-canaliculaire des conduits biliaires. Des problèmes au niveau de la vésicule biliaire sont également présents chez plus de 40% des patients atteints de mucoviscidose (Ratjen and Doring, 2003; Akata and Akhan, 2007).

Le pancréas :

- Obstruction et dilatation des conduits pancréatiques conduisant à une insuffisance pancréatique exocrine chez les patients porteurs de deux mutations dites sévères.
- Les enzymes pancréatiques ne sont plus déversées dans les intestins causant la lyse du tissu, l'apparition de kystes et la fibrose du pancréas. Cette détérioration du tissu commence déjà lors du développement fœtal.
- Insuffisance endocrine dans 25 à 50 % des cas causée par la destruction des îlots de Langerhans (Cutting, 2002; Ratjen and Doring, 2003).
- La déficience en enzyme pancréatique entraîne un retard de croissance saturo-pondérale suite à une mauvaise absorption des protéines, des graisses et des

vitamines lipo-solubles. Sans complément enzymatique, cette situation peut mener à de graves problèmes tels qu'une absence de tissu adipeux, une hypoprotéïnémie, une perturbation du système nerveux et visuel causée par la déficience en vitamine A et E ou une déminéralisation osseuse résultant d'un manque en vitamine D (Cutting, 2002; Ratjen and Doring, 2003).

1.4. La mucoviscidose « non-classique » ou « atypique »

Alors que la majorité des patients atteints de mucoviscidose sont diagnostiqués dans le courant de leur première année de vie en raison d'un désordre pulmonaire et/ou d'une insuffisance pancréatique, un nombre croissant de patients sont seulement diagnostiqués à l'âge adulte et présentent des symptômes atypiques. En effet, dans la décennie ayant suivi l'introduction du test à la sueur, il est apparu que certains adultes présentaient des symptômes incomplets ou modérés liés à la mucoviscidose. Cette classe « atypique » regroupe des individus ayant un phénotype mucoviscidosique pour au moins un organe mais avec un test à la sueur normal ou intermédiaire. Pour la plupart de ces patients, une mutation sur un seul allèle, voire aucune mutation connue n'a été détectée. Dans leur cas, la seule manière de confirmer la présence d'une mucoviscidose est de séquencer la totalité du gène et de vérifier l'absence de sperme, de contrôler les fonctions du foie et de la vésicule biliaire, de mettre en évidence une obstruction intestinale ou de faire une mesure de différence de potentiel nasal (Davis, 2006; De Boeck et al., 2006; Kerem, 2006).

1.5. Le gène *Cftr*

1.5.1. Clonage et caractérisation du gène *Cftr*

La mucoviscidose est la maladie génétique autosomique récessive la plus fréquente dans la population caucasienne. Elle affecte environ une personne sur 2500 impliquant qu'un européen sur 25 est porteur hétérozygote d'un allèle *Cftr* muté. Le gène causant la mucoviscidose a été identifié en 1989 et celui-ci est nommé *Cftr* « *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* » (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989). Ce gène réside sur le bras long du chromosome 7 et comprend 250 kb répartis en 27 exons. Il est transcrit en un ARNm de 6500 paires de bases, présent dans les différents tissus épithéliaux classiquement affectés par la mucoviscidose. Parmi les mutations les plus fréquemment rencontrées, la délétion de la phénylalanine en position 508 ($\Delta F508$) a

été mise en évidence chez plus de 70 % des personnes atteintes de la mucoviscidose dans la population caucasienne (Rowe et al., 2005).

Diverses hypothèses ont été soulevées pour expliquer la fréquence élevée de mutation $\Delta F508$ sur tout le continent européen : un avantage sélectif des hétérozygotes, une ségrégation en faveur de l'allèle mutant ou un taux de mutations élevé ; cependant l'hypothèse de la dérive génétique semble être la plus appropriée (Cutting, 2002). La fréquence élevée d'allèles $\Delta F508$ dans cette population a pu être expliquée grâce à l'étude moléculaire menée sur le gène *Cfr*. Sur base de la répartition et de la fréquence de mutations $\Delta F508$, Bertranpetit et Clafell ont supposé que la mutation $\Delta F508$ a trouvé son origine sur le Plateau iranien (Morral et al., 1994). Les porteurs de cette mutation ont émigré vers l'Europe dans la région du Balûchistân où les mariages consanguins étaient des pratiques courantes. Ils ont ensuite migré progressivement vers le nord-ouest de l'Europe où la mutation $\Delta F508$ représente environ 70% des cas de mucoviscidose (Dawson and Frossard, 2000). Toutefois, l'hypothèse selon laquelle les hétérozygotes ont un avantage sélectif pourrait également expliquer la distribution géographique des différentes mutations. En effet, face à des infections telles que le choléra ou la fièvre typhoïde, les hétérozygotes ont un taux de survie plus élevé que les personnes « saines ». La toxine du choléra induit une augmentation de l'AMP cyclique qui, à son tour, stimule la sécrétion de chlore via le canal CFTR provoquant ainsi des diarrhées massives. Chez les hétérozygotes, leurs sécrétions sont diminuées de moitié limitant les pertes de fluide et de chlore. Cet avantage leur permettrait de résister plus efficacement aux effets néfastes de la toxine du choléra (Korf, 2000). Il en serait de même pour les infections par *Salmonella typhi* qui se sert du canal CFTR pour pénétrer dans les cellules épithéliales intestinales (Pier et al., 1998).

1.5.2. La protéine CFTR

Le clonage du gène codant pour la protéine CFTR a grandement facilité l'étude de sa structure, de sa fonction, de sa régulation, de sa biosynthèse et de sa dégradation. CFTR est un membre de la superfamille des transporteurs membranaires ABC (*ATP-Binding Cassette*). Cette famille regroupe les protéines eucaryotes et bactériennes qui importent et exportent de petites molécules telles que les sucres, les protéines, les métaux ou encore les médicaments. Parmi le grand nombre de protéines ABC, CFTR est la première à être identifiée comme un canal ionique. Son appartenance à cette famille d'ATPase fait de CFTR un canal ionique

différent des autres canaux qui sont habituellement activés suite à la liaison d'un ligand ou à une modification de courant électrique (Gadsby et al., 2006; Aleksandrov et al., 2007).

La structure de CFTR, proche des autres membres de sa famille et présentée dans la Figure 4, consiste en deux moitiés similaires. Chacune des moitiés contient six segments transmembranaires et un domaine de liaison à l'ATP (NBD). Ces deux moitiés sont reliées entre elles par un domaine de régulation (domaine R) de 241 acides aminés qui contient de nombreux résidus chargés et plusieurs sites consensus de phosphorylation (Bear et al., 1992; Gadsby et al., 2006; Aleksandrov et al., 2007).

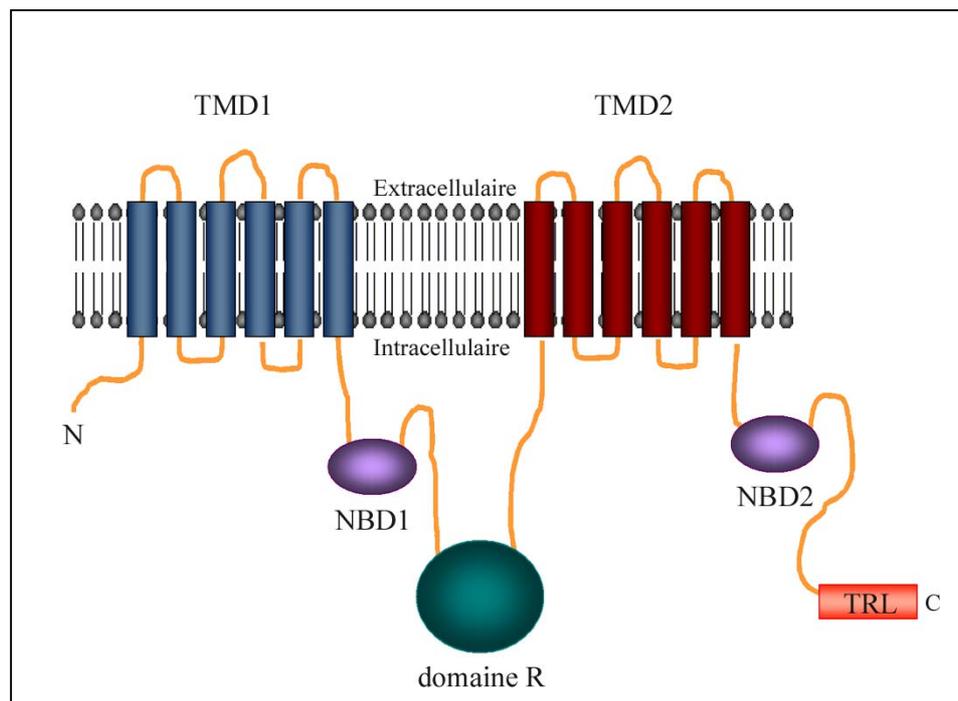


Figure 4 : Représentation de la protéine CFTR.

CFTR est composée de deux domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2), deux domaines intracellulaires de liaison nucléotidique (NBD1 et NBD2) et un domaine intracellulaire régulateur (domaine R).

Régulation de l'activité du canal CFTR

A l'état basal, aucun courant chlore n'est mesuré au travers du canal CFTR. Son activation n'est possible qu'en présence d'une augmentation intracellulaire d'AMPC, d'une phosphorylation au niveau de sa région régulatrice et d'une hydrolyse d'ATP.

Jusqu'à récemment, on pensait que l'ouverture du canal CFTR était contrôlée par deux processus séquentiels : la phosphorylation du domaine régulateur (domaine R) et la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. L'activation de la PKA (protéine kinase AMPC dépendante)

engendre la phosphorylation du domaine R. Une fois la région régulatrice activée, l'hydrolyse de l'ATP au niveau NBD1 (*nucleotide binding domain 1*) permet l'ouverture du canal alors que l'hydrolyse de l'ATP au niveau NBD2 enclenche la fermeture du canal CFTR (Akabas, 2000). Des études biochimiques récentes ont montré que seul le NBD2, et non le NBD1, était capable d'hydrolyser l'ATP et que le NBD1 avait une affinité de liaison plus grande pour l'ATP que le NBD2 (Szabo et al., 1999; Zhou et al., 2005). Sur base de ces nouveaux éléments, le modèle décrivant le mécanisme d'ouverture/fermeture du canal CFTR s'est vu affiné (Figure 5). Suite à une augmentation intracellulaire d'AMPC, la région régulatrice est phosphorylée par la PKA. Une fois phosphorylée, la protéine CFTR a besoin d'ATP pour s'ouvrir. La liaison de deux molécules d'ATP au niveau des deux NBDs permet un rapprochement de ces deux domaines, enfermant les molécules d'ATP dans une poche. Grâce à cette interaction intramolécule, un signal est transmis à la région transmembranaire, permettant l'ouverture du canal. Cette ouverture est maintenue jusqu'à l'hydrolyse de l'ATP au niveau du NBD2 menant à l'interruption de la liaison NBD1-NBD2. La perte de ce signal déclenche la fermeture du canal jusqu'à la présence d'un nouveau pool d'ATP (Gadsby et al., 2006; Zhou et al., 2006).

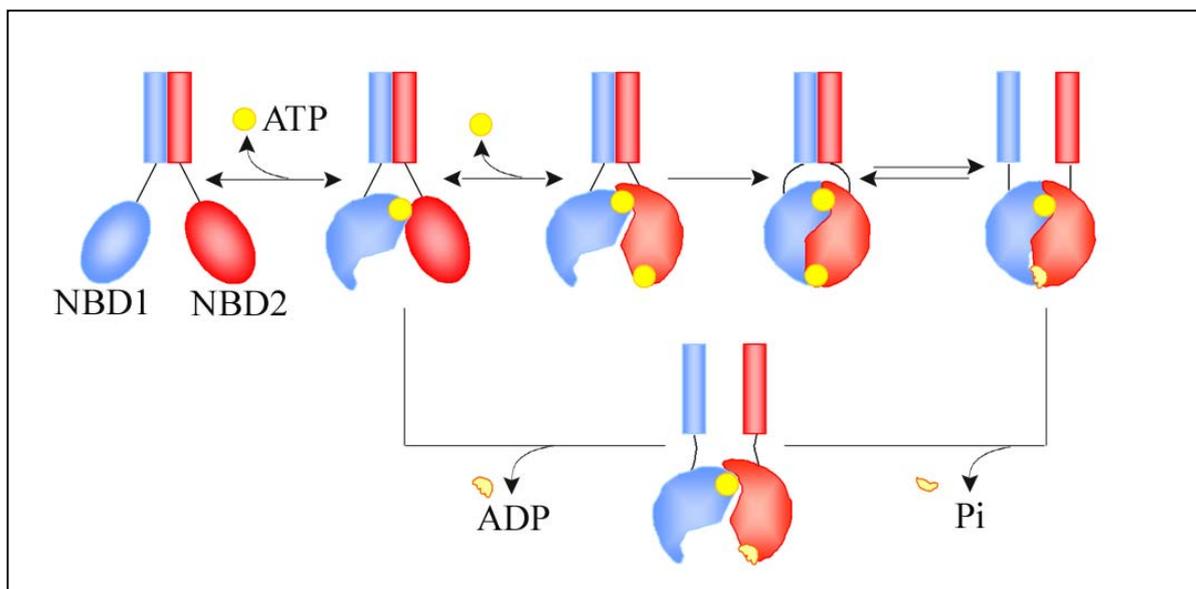


Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme d'ouverture du canal CFTR.

Le domaine R n'est pas représenté. Une molécule d'ATP se lie au NBD1, suivie d'une deuxième molécule qui se lie au NBD2. Cette deuxième interaction rapproche les deux domaines NBDs générant ainsi une interaction intramolécule. Ce rapprochement induit l'ouverture du canal CFTR jusqu'au moment de l'hydrolyse de l'ATP au niveau NBD2 avec libération d'un phosphate inorganique (Pi). Cette réaction rompt l'interaction intramolécule conduisant à la fermeture du canal.

Le transport épithélial ionique

Les cellules épithéliales sont polarisées et disposent d'un mécanisme de transport actif de l'eau et/ou des ions. Les épithélia peuvent avoir une fonction de sécrétion, d'absorption voire les deux, en relation avec leur état d'activation. Alors que le processus de sécrétion a principalement lieu dans les cellules séreuses et dans les glandes sous-mucosales (Figure 6), l'absorption des sels est réalisée au niveau du reste de la surface épithéliale (Figure 7). Ce mécanisme permet de contrôler activement le volume de liquide et la concentration en sels à la surface des cellules épithéliales.

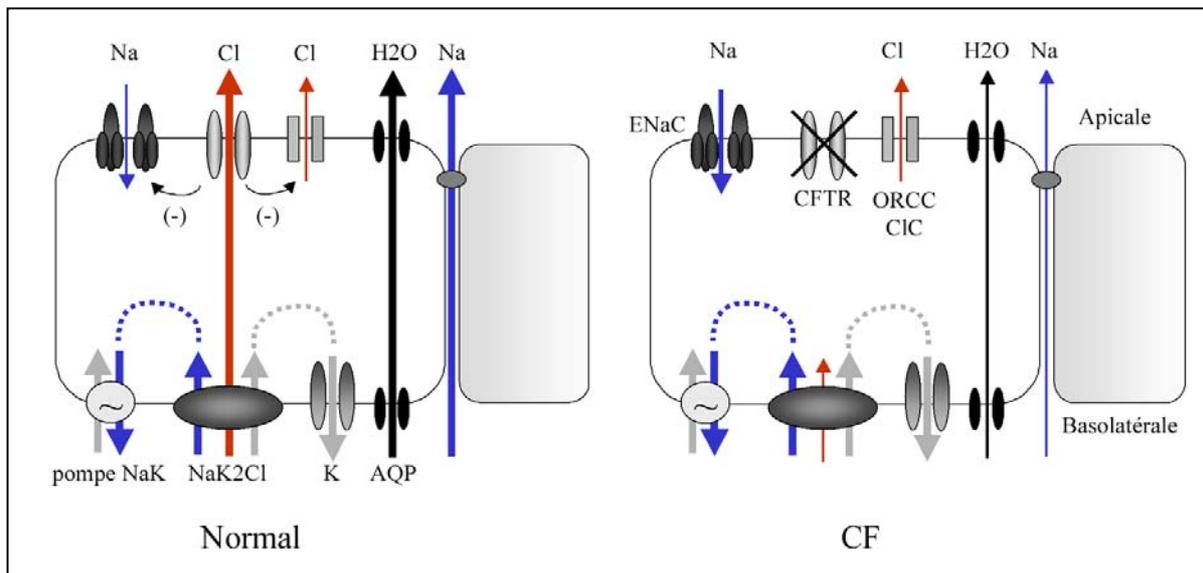


Figure 6 : Mécanisme de sécrétion des sels par les cellules épithéliales.

La sécrétion de sels se fait via l'activation du canal CFTR mais également par d'autres canaux chlores (les ORCC, outward rectifying chloride channel et les CIC, canaux chlore dépendants du calcium). En situation non pathologique, le chlore entre dans la cellule par un co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ situé dans la membrane basolatérale. Une fois entrés, le sodium et le potassium sont directement renvoyés dans la sous muqueuse, ce qui implique une augmentation de la concentration en chlore dans la cellule. L'activation du canal CFTR permet au chlore de sortir au niveau de la membrane apicale en suivant son gradient de concentration. Cette sortie provoque un mouvement des ions sodium par la voie paracellulaire selon son gradient électrochimique. La diffusion d'eau se fait quant à elle, par osmose via les aquaporines (AQP). Dans les cellules mutées, la sécrétion de chlore est réduite, engendrant une absorption massive du sodium au sein de la cellule et un défaut de sécrétion d'eau dans la lumière bronchique.

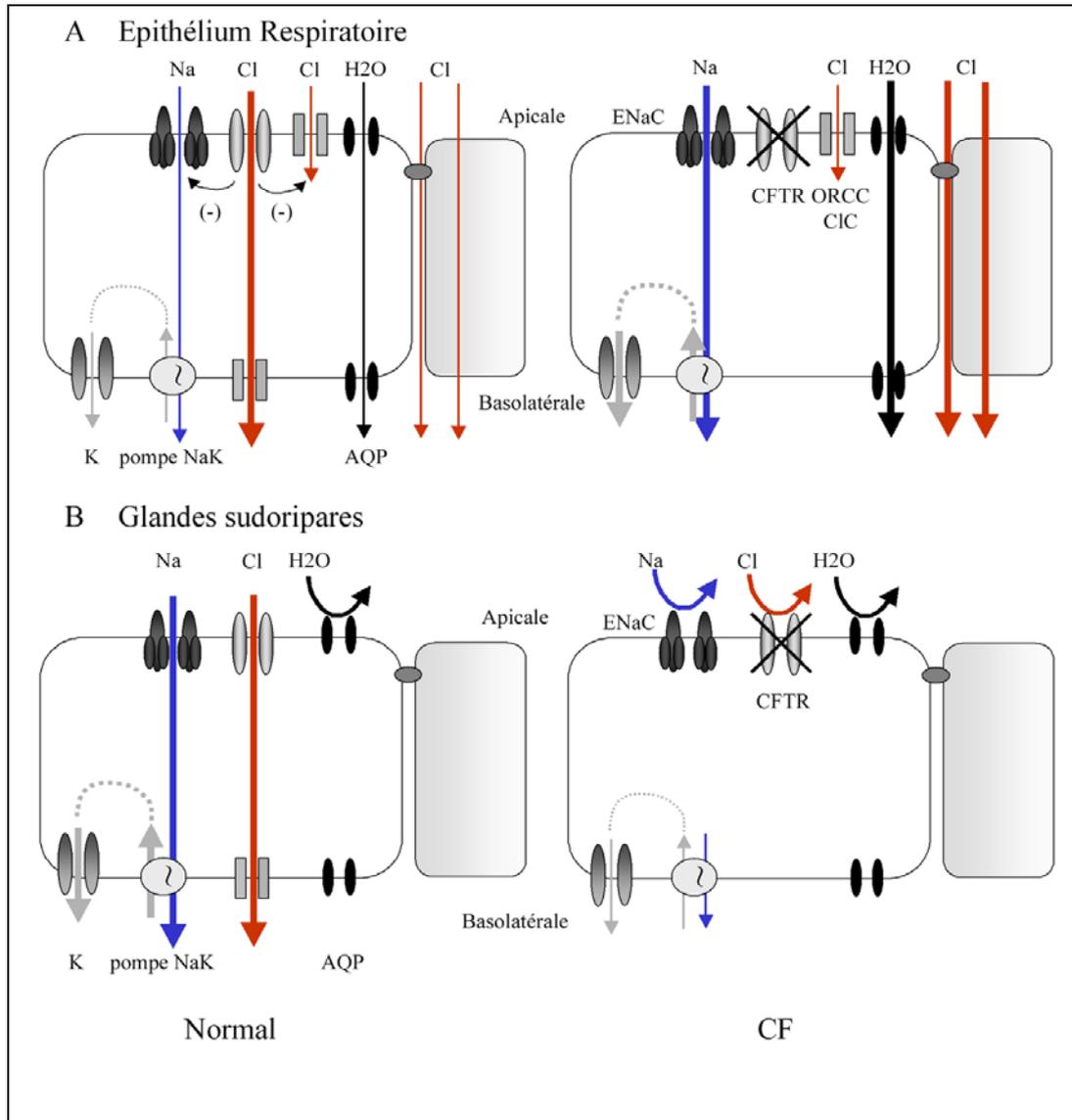


Figure 7 : Mécanisme d'absorption des sels par l'épithélium respiratoire et par les glandes sudoripares.

(A) *Epithélium respiratoire.* L'absorption de sels se fait via les canaux ENaC (epithelial Na⁺ channel) au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales. Ceux-ci sont contrôlés négativement par CFTR. Le chlore est absorbé en réponse à une différence de potentiel transépithélial. Le transport de sels est accompagné par un flux d'eau iso-osmotique via les aquaporines (AQP). Chez les patients mucoviscidiques, l'absence d'inhibition du canal ENaC par le canal CFTR, entraîne une absorption massive de sodium suivi par le chlore qui suit son gradient électrochimique. L'eau est ensuite absorbée afin de maintenir l'osmolarité du liquide périciliaire. B) *Les glandes sudoripares.* Les cellules de ce conduit sont imperméables à l'eau, ce qui permet une sécrétion de sueur hypotonique. Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'absence du canal CFTR dans cette partie génère une différence de potentiel très élevée qui a pour conséquence une diminution drastique de l'absorption du sodium via les canaux ENaC. Il résulte de ce défaut d'absorption une concentration en sel plus élevée dans la sueur de ces patients.

Les autres fonctions de CFTR

La protéine CFTR est bien connue pour son rôle de canal à chlore mais elle est également décrite pour interagir avec de nombreuses protéines impliquées dans des fonctions diverses. Elle est capable de réguler le canal ENaC (Kunzelmann et al., 2000), de réguler les canaux chlores CIC (Gentsch et al., 2003) et ORCC (Jovov et al., 1995) ainsi que les canaux potassiques ROMK (*inwardly rectifying ATP-sensitive renal potassium channel*) (Yoo et al., 2004). Cette régulation de CFTR sur ces autres canaux ioniques pourrait être liée à sa partie C-terminale. En effet, la protéine CFTR possède à son extrémité C-terminale un motif (D/E) T (R/K) L, fortement conservé et qui correspond à un domaine d'interaction protéique appelé PDZ (**P**SD95, **D**lg, **Z**O-1). Différentes protéines contenant un domaine PDZ sont déjà connues pour interagir avec la partie C-terminal de CFTR : NHERF1 et 2 (*sodium-proton exchange regulatory factor*), CAP-70 (*CFTR-associated protein 70*) et CAL (CFTR-associated ligand). L'interaction de cette dernière avec CFTR permet une régulation du transit de CFTR entre l'appareil de golgi et la membrane apicale. Quant à NHERF1, NHERF2 et CAP70, elles forment un complexe macromoléculaire avec CFTR rendant cette dernière beaucoup plus stable au niveau de la membrane apicale (Guggino, 2004). Elle est également connue pour réguler le transport des ions HCO_3^- . Le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) joue un rôle déterminant dans la sécrétion des ions HCO_3^- . Une étude a mis en évidence la présence de ce co-transporteur dans le complexe comprenant CFTR et NHERF1, ainsi que l'inhibition de celui-ci par le CFTR (Park et al., 2002). Récemment, une étude protéomique a été réalisée sur la protéine CFTR afin d'identifier l'ensemble des protéines interagissant avec elle. Une centaine de protéines, pour la plupart des chaperones ou des co-chaperones, ont été mises en évidence. Elle interviennent principalement dans le repliement de la protéine CFTR et dans son export vers la membrane (Wang et al., 2006). CFTR est également reliée à des processus biologiques cellulaires plus généraux tels que l'endo- et l'exocytose, ou encore l'acidification des vésicules cytoplasmiques (Bradbury et al., 1992; Prince et al., 1994)

CFTR interagit avec de nombreuses protéines intra-cytoplasmiques mais elle agit également comme un récepteur aux lipopolysaccharides (LPS) (Pier et al., 1997; Pier, 2000; Pier, 2002; Coleman et al., 2003). Selon les travaux de Pier et ses collaborateurs, CFTR jouerait le rôle de récepteur aux LPS de *P. aeruginosa*. Suite à cette interaction, NF- κ B serait activé entraînant une réponse inflammatoire via les neutrophiles qui phagocyteraient et élimineraient les pathogènes. Cette hypothèse permettrait d'expliquer le problème d'élimination de *P. aeruginosa* chez les patients mucoviscidosiques.

1.5.3. Les mutations dans le gène *Cftr*

A ce jour, plus de 1500 mutations du gène *Cftr* induisant la mucoviscidose ont été recensées (www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html). Ces mutations ont été mises en évidence dans la séquence codante ou dans des sites d'épissage de l'ARN messager et celles-ci ont été classées sur base du mécanisme par lequel elles induisaient la pathologie. A ce jour, on dénombre six classes de mutations (Figure 8) (Rowe et al., 2005).

Figure 8 : Les différentes classes de mutations. D'après Rowe, 2005

La classe 1 regroupe les mutations générant un codon stop. La classe 2, comprend la mutation $\Delta F508$. Ces protéines sont dégradées dans le réticulum endoplasmique suite à un mauvais repliement. Les mutations de classe 3, engendrent un canal inactif alors que les mutations de classe 4 diminuent la conductance du canal. La cinquième classe regroupe les mutations situées dans le promoteur ou dans un site d'épissage diminuant l'abondance de la protéine mais pas sa fonction. La dernière classe reprend les mutations qui accélèrent le recyclage de la protéine.

La classe I regroupe les mutations, telles que G542X et W1282X, qui engendrent un codon stop menant à la terminaison prématurée de la traduction de l'ARN messager. Cet arrêt prématuré de la traduction entraîne une absence de production de protéine CFTR. Les mutations de classe II incluent la mutation $\Delta F508$, mutation la plus fréquemment rencontrée dans la population caucasienne. Cette mutation a pour conséquence une délétion d'un résidu phénylalanine (ΔF) en position 508. La protéine mutée, incapable de se replier correctement, est acheminée vers le protéasome où elle sera dégradée peu de temps après sa synthèse avant d'avoir atteint la membrane plasmique. Les mutations de classe III telles que la mutation G551D n'affectent pas la production ni l'acheminement de la protéine CFTR mutée vers la membrane apicale, mais engendrent des canaux insensibles à l'activation par la PKA, entraînant une absence de courant chlore. Ces trois classes de mutations sont dites sévères car la quantité de protéine CFTR fonctionnelle présente à la surface membranaire est inférieure à 1% engendrant une imperméabilité au chlore à la surface de ces cellules épithéliales.

Par opposition, les mutations de la classe IV, V et VI n'empêchent ni la production ni l'acheminement de la protéine CFTR au niveau de la membrane apicale mais elles provoquent une diminution importante du courant chlore. En effet, la classe IV regroupe les mutations engendrant une probabilité d'ouverture ou une conductance réduite du canal CFTR, telles que les mutations R117H, R347P et R334W. La présence d'une activité réduite du canal CFTR induit des symptômes atténués en comparaison avec les patients présentant une absence totale de la protéine CFTR dans la membrane apicale. Plus récemment, une cinquième classe et une sixième classe de mutations ont été découvertes. La cinquième reprend les mutations situées dans le promoteur ou sur un site d'épissage engendrant une diminution significative du nombre de transcrits CFTR et par conséquent de la quantité de protéine CFTR fonctionnelle au niveau de la surface apicale (Pilewski and Frizzell, 1999; Cutting, 2002; Rowe et al., 2005). La dernière classe, quant à elle, reprend les mutations entraînant une accélération du recyclage de la protéine CFTR (Haardt et al., 1999).

1.5.4. La relation entre le génotype et le phénotype

La prédiction du phénotype à partir du génotype est au cœur de nombreuses recherches. Il semblerait que certaines caractéristiques de la pathologie soient corrélées avec la classe de mutations. En effet, à partir du génotype, il est possible de prédire le phénotype avec un haut degré de précision, et ceci au niveau des glandes sudoripares, du pancréas et du système reproducteur. La Figure 9 nous montre que le pourcentage de protéines CFTR

fonctionnelles détermine la gravité de la pathologie. Elle indique également que les conduits génitaux sont les premiers organes touchés lorsque l'expression de CFTR est inférieure à 10% du taux normal. Des dysfonctionnements au niveau des poumons et des glandes sudoripares surviennent lorsque le taux de protéines CFTR fonctionnelles chute en dessous des 5%. Enfin, en dessous de 1%, une insuffisance pancréatique apparaît (Pilewski and Frizzell, 1999; Davies et al., 2005).

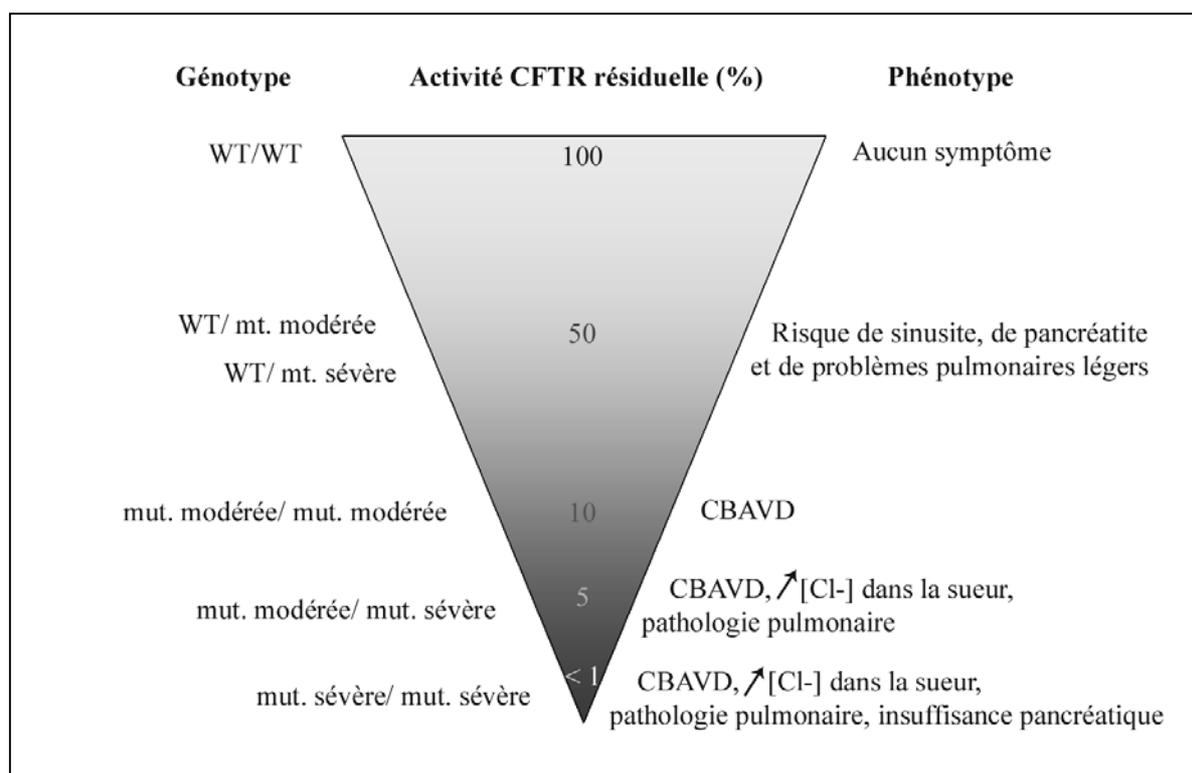


Figure 9: Relation entre la quantité de CFTR fonctionnelle et le dysfonctionnement des organes.

WT, allèle sain ; mut, mutation ; CBAVD, absence bilatérale congénitale des canaux déférents.

Bien qu'un dysfonctionnement pulmonaire apparaisse lorsque le patient est atteint d'au moins une mutation sévère, une corrélation entre le génotype et le phénotype n'est pas toujours possible. En effet, il a été observé qu'il existait un degré de sévérité pulmonaire très variable même chez des patients homozygotes pour la mutation $\Delta F508$. Le facteur environnemental et le terrain génétique de l'hôte contribuent fortement à la sévérité de la maladie (Boucher, 2004). En effet, des études menées sur des jumeaux monozygotes, maintenus dans des conditions environnementales différentes, ont clairement démontré que l'environnement pouvait avoir un rôle important dans la sévérité des symptômes. Les facteurs tels qu'un diagnostic tardif, une absence de traitement, la fréquence des infections ainsi que une exposition au tabac ou à la pollution de l'air contribuent à la détérioration des voies

respiratoires. Toutefois, la mise en évidence de symptômes pulmonaires différents chez des jumeaux dizygotes ou entre frères et sœurs maintenus dans des conditions environnementales identiques, indique que le phénotype pulmonaire est également influencé par des facteurs génétiques autre que CFTR.

Ces influences génétiques sont causées par des variations (polymorphismes) dans des gènes pouvant influencer la probabilité ou la sévérité de certaines maladies mais également la réponse à certains agents pharmacologiques (Davies et al., 2005). Plusieurs gènes ont été identifiés comme pouvant modifier le phénotype des patients atteints de mucoviscidose : l'*α1AP* (*α1-antiprotease*), l'*ADRβ2* (*β2-adrenergic receptor*), les *GSTM1* et *GSTP1* (*gluthathion-S-transferases*), l'interleukine 10 (IL-10), la *NOS3* (*nitric oxide synthase 3*), la *MBL2* (*mannose-binding lectin 2*), le *TGFβ1* (*Transforming Growth Factor 1*) et le *TNFα* (*tumor necrosis factor 1*). Une étude réalisée sur plus de 800 patients homozygotes pour la mutation ΔF508, indique que des polymorphismes dans le gène *TGFβ1* modifient la sévérité des symptômes pulmonaires chez les patients souffrant de mucoviscidose. Cette découverte est en accord avec d'autres études réalisées dans le cadre d'autres maladies respiratoires telles que l'asthme et les maladies pulmonaires obstructives chroniques (Drumm et al., 2005).

2. L'inflammation

2.1. Généralité

L'inflammation est définie comme une réaction physiologique de l'organisme face à une agression telle qu'une brûlure, une infection, une réaction autoimmune ou une allergie. Habituellement, l'inflammation est un processus bénéfique, rapide et de courte durée : son but est d'éliminer les agents pathogènes ou de réparer les lésions tissulaires. Ce processus inflammatoire fait intervenir les cellules du système immunitaire, des molécules plasmatiques, des modifications de la matrice extra-cellulaire et de nombreux médiateurs chimiques pro- ou anti-inflammatoires pouvant modifier ou entretenir la réponse inflammatoire. Quelle que soit la nature de l'agent pathogène, le déroulement d'une réaction inflammatoire présente des caractères morphologiques généraux et des mécanismes communs. Néanmoins, les différentes étapes présentent des variations liées à la nature de l'agent pathogène, l'organe où elle se déroule et le terrain physiologique de l'hôte. L'ensemble de ces éléments conditionne l'intensité et la durée de la réaction inflammatoire ainsi que son impact lésionnel.

2.1.1. La réponse inflammatoire

Dans les minutes qui suivent « l'agression » (ex : une infection ou une lésion tissulaire), il se produit une vasodilatation des vaisseaux sanguins et une augmentation de leur perméabilité. Il en résulte une infiltration de neutrophiles dans les espaces tissulaires. Ces neutrophiles phagocytent les pathogènes et libèrent des médiateurs qui contribuent à la réponse inflammatoire. Par la suite, ces médiateurs vont attirer les macrophages qui phagocytent à leur tour les pathogènes et qui libèrent des cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α . Ces trois cytokines induisent une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, ce qui permet aux neutrophiles, aux monocytes et aux lymphocytes circulants d'adhérer à la paroi des vaisseaux sanguins et de migrer dans les tissus. L'IL-1 β et le TNF- α agissent également sur les macrophages et les cellules endothéliales pour induire la production de chimiokines. Ces agents agissent en tant que puissants facteurs chimiotactiques des neutrophiles. Ces différents phénomènes participent à l'élimination des agents infectieux et à la réparation tissulaire (Goldsby et al., 2003).

2.1.2. Les médiateurs chimiques

Des médiateurs chimiques d'origine plasmatique ou cellulaire interviennent à tous les stades de l'inflammation. Les médiateurs d'origine plasmatique sont présents dans le plasma sous la forme de précurseurs qui doivent être activés (généralement par protéolyse) pour acquérir leurs propriétés. Ils interviennent principalement lors de lésions endothéliales. Par contre, les médiateurs cellulaires sont soit préformés et séquestrés dans des granules intracellulaires (le stimulus inflammatoire entraînant la dégranulation) soit synthétisés *de novo* en réponse à un stimulus.

Les médiateurs plasmatiques

Le plasma contient quatre systèmes interconnectés : le système des kinines, le système de coagulation, le système fibrinolytique et le système du complément. Lorsque survient une lésion tissulaire, ces quatre systèmes sont activés, déclenchant des cascades enzymatiques qui induisent une augmentation de la perméabilité vasculaire et du taux de plasmine. Cette enzyme protéolytique dégrade les caillots de fibrine en produits chimiotactiques pour les neutrophiles et les monocytes et active le complément. L'activation du complément se traduit par des flux de cellules phagocytaires sur les sites d'entrée de l'antigène (Goldsby et al., 2003).

Les médiateurs cellulaires

Les médiateurs cellulaires sont principalement libérés par les mastocytes, les plaquettes sanguines et par les leucocytes. Parmi ces médiateurs cellulaires, on retrouve les cytokines, les facteurs de croissance, les phospholipides membranaires, les enzymes lysosomiales et les espèces réactives de l'oxygène.

Les **cytokines** sont des protéines régulatrices de faible masse moléculaire sécrétées par les cellules leucocytaires (lymphocytes et monocytes-macrophages activés) et non leucocytaires (plaquettes, cellules endothéliales et épithéliales). Elles agissent à faible concentration, exerçant leur action par l'intermédiaire d'une fixation à des récepteurs membranaires de haute affinité. Les cytokines régulent l'intensité et la durée de la réponse immunitaire en stimulant ou en inhibant l'activation, la prolifération et/ou la différenciation des différentes cellules ainsi qu'en régulant la sécrétion des autres cytokines (Goldsby et al., 2003). Les cytokines comprennent les interleukines (Ozaki and Leonard, 2002), les interférons (Leon and Zuckerman, 2005), les facteurs de nécrose (TNF, *Tumor Necrosis*

Factor) (Mukhopadhyay et al., 2006) et les chimiokines (cytokines aux propriétés chimio-tactiques) (Hansell et al., 2006).

Les **facteurs de croissance** sont des facteurs peptidiques proches des cytokines influençant la prolifération, la différenciation et la mobilité cellulaire par des actions endocrines, paracrines ou autocrines. Dans la réaction inflammatoire, ils interviennent surtout dans la prolifération fibroblastique et endothéliale, dans la fibrogenèse cicatricielle et dans la régénération épithéliale. Les macrophages activés produisent notamment du PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), du FGF (*Fibroblast Growth Factor*) et du TGF β (*Transforming Growth Factor*) (Singh and Ramji, 2006).

Les **médiateurs lipidiques** sont des métabolites dérivés de l'acide arachidonique ou du facteur d'activation plaquettaire. L'acide arachidonique est un acide gras formé par dénaturation des phospholipides des membranes cellulaires sous l'influence de la phospholipase A2. Il existe deux voies métaboliques principales de l'acide arachidonique : la voie de la cyclo-oxygénase et celle de la lipo-oxygénase. La première conduit principalement aux médiateurs tels que le thromboxane A2 (vasoconstricteur et agrégant plaquettaire), la prostacycline (anti-agrégant plaquettaire) et les prostaglandines PGD2, E2 et F2 dont les effets varient fortement en fonction de la concentration et du type de prostaglandine (vasodilatation, hyper-perméabilité vasculaire, chimiotactisme, douleur, fièvre) (Linton and Fazio, 2004). La voie de la lipo-oxygénase mène, quant à elle, aux leucotriènes dont le leucotriène B4 (LTB4, chimio-attractant puissant) et les leucotriènes C4, D4 et E4 (vasoconstricteurs, bronchoconstricteurs et capables d'augmenter la perméabilité vasculaire) (Funk, 2001). Le facteur d'activation plaquettaire (PAF) est également synthétisé à partir des phospholipides membranaires par de nombreuses cellules de la réaction inflammatoire (polynucléaires neutrophiles et basophiles, mastocytes, monocytes-macrophages, endothélium, plaquettes). Ses effets sont nombreux, par action sur des récepteurs spécifiques ou par induction d'autres médiateurs : augmentation de la perméabilité vasculaire, agrégation des plaquettes, stimulation de l'attraction des leucocytes et de leur adhésion à l'endothélium (Prescott et al., 2000).

Les **espèces réactives de l'oxygène** sont formées principalement par les neutrophiles. Ces espèces réactives de l'oxygène ont une action nécrosante locale et peuvent endommager les cellules endothéliales. Elles inactivent des anti-protéases telles que l' α -antitrypsine et activent la phospholipase A2 entraînant ainsi la synthèse de leucotriène B4 et d'autres chimio-attractants des neutrophiles et la synthèse du PAF. Leurs effets potentiellement dangereux

sont contrebalancés par des anti-oxydants présents dans le sérum, les liquides extra-cellulaires et les cellules (Goldsby et al., 2003).

Les **enzymes lysosomiales** telles que la myéloperoxydase, le lysozyme, la cathepsine G, la phospholipase A2, les hydrolases acides, l'élastase, la collagénase, la lactoferrine, la gélatinase, l'histaminase et la phosphatase alcaline sont présentes dans les neutrophiles et les macrophages. Ces enzymes sont déversées dans les vacuoles de phagocytose et interviennent dans la digestion des produits de phagocytose. Ces enzymes confèrent aux neutrophiles et aux macrophages une activité bactéricide et de dégradation du tissu conjonctif au niveau du foyer inflammatoire (Dallegrì and Ottonello, 1997; Pham, 2006).

2.1.3. Le remodelage de la matrice

Introduction

La matrice extra-cellulaire assure la cohésion et l'organisation des tissus et leur résistance à l'étirement. Elle est constituée de fibres de collagène (de différents types biochimiques), d'élastine (fibres élastiques), de fibronectine, de laminine et de mucopolysaccharides. L'échange de messages entre des molécules de la matrice et les cellules se fait par l'intermédiaire des molécules d'adhésion de type intégrines pour la polarisation des cellules, leur forme et la régulation d'expression de certains gènes. D'un autre côté, les communications intercellulaires sont assurées par les cytokines pouvant s'accumuler dans la matrice extra-cellulaire. Cette séquestration influence la biodisponibilité de ces cytokines ainsi que leur site d'action et leur rapidité d'action (Pardo and Selman, 2006).

Les métalloprotéases matricielles (MMPs) sont des endopeptidases impliquées dans la dégradation et la réparation tissulaire, la migration cellulaire ainsi que dans le recyclage des composants de la matrice extracellulaire (Courtney et al., 2004). Ces protéines ont un rôle important dans le processus normal de remodelage mais également dans la destruction de la matrice extracellulaire observée lors des pathologies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde, les plaques d'athérosclérose et la mucoviscidose (Ratjen et al., 2002; Deguchi et al., 2006; Ye et al., 2007)

La fibrose

L'évolution d'une réaction inflammatoire chronique prolongée est souvent la fibrose. La constitution d'une fibrose résulte d'une rupture de l'équilibre de la matrice extra-cellulaire : une augmentation des processus de synthèse et de dépôt des constituants de la matrice d'une

part et une diminution de leur dégradation d'autre part. Les mécanismes physiopathologiques de la fibrogenèse sont peu connus, cependant, plusieurs facteurs semblent avoir un rôle clef tels que le TGF β , le PDGF, le FGF et l'EGF, l'IL-1 β et le TNF- α . Ces différents facteurs stimulent la prolifération des fibroblastes et des cellules musculaires lisses ainsi que leur migration vers le lieu d'agression. L'IL-1 β et la TNF- α , tout comme le TGF β , sont également impliqués dans la synthèse des différents constituants de la matrice en induisant la transcription des gènes de la matrice et en stabilisant leur ARNm. De plus, le TGF β diminue la dégradation de la matrice en inhibant la sécrétion de collagénases facilitant ainsi le dépôt des constituants de la matrice (Singh and Ramji, 2006).

2.2. Impact de la mutation Δ F508 sur la réaction inflammatoire

2.2.1. La genèse des symptômes pulmonaires

Un système respiratoire sain est maintenu stérile à partir de la première division bronchique. Malgré les contacts incessants avec les virus et les bactéries contenus dans l'air inspiré, cette stérilité est maintenue grâce à plusieurs systèmes de défenses. La surface bronchique, composée de cellules ciliées, est recouverte d'un fin film (+/- 30 μ m) de liquide contenant un gel de mucus. Ce système mucociliaire, aidé par la toux, permet un nettoyage mécanique des voies respiratoires. Ce film contient de nombreux composants telles que des protéases/anti-protéases, des oxydants/anti-oxydants, des antibiotiques et des anticorps qui travaillent de concert pour détruire les pathogènes sans endommager les poumons. Ce mécanisme est renforcé par les cellules immunitaires impliquant les neutrophiles, les cellules dendritiques et les macrophages qui sont recrutés par des molécules de signalisation présentes dans liquide mucociliaire (Wine, 1999).

Chez les patients atteints de mucoviscidose, les infections des voies aériennes basses sont très fréquentes, difficiles voire impossibles à éradiquer. Différentes études ont montré que la colonisation du tissu pulmonaire est réalisée par des pathogènes spécifiques et de manière séquentielle. On observe ainsi la présence de *Staphylococcus aureus* et d'*Hemophilus influenzae* dans le courant de la première année tandis que *Pseudomonas aeruginosa* s'installe endéans les 20 mois, souvent après l'apparition des deux premiers. Ces infections, qui sont bénignes chez les individus normaux, sont sévères chez les patients atteints de mucoviscidose et provoquent une infiltration massive de neutrophiles dans les tissus pulmonaires (Cutting, 2002).

2.2.2. Le lien entre CFTR et la persistance des infections

Très rapidement, un lien entre le dysfonctionnement de la protéine CFTR et une déficience dans l'élimination des bactéries fut établi. Depuis lors, deux hypothèses ont émergé considérant le rôle de CFTR comme canal à ion chlore à la base de la problématique. La première hypothèse, dite de la concentration élevée en sel, est soutenue par l'équipe de M. Welsh (Smith et al., 1996; Zabner et al., 1998) alors que la deuxième hypothèse, basée sur une déshydratation de la surface pulmonaire, est proposée par R. Boucher et son équipe (Matsui et al., 1998; Boucher, 2007).

Selon la première hypothèse (Figure 10), le dysfonctionnement du canal CFTR engendre une diminution de la conductance transépithéliale en chlore entraînant une concentration en sel élevé. Cette haute teneur en sel interfère avec les antibiotiques naturels tels que les défensines et le lysosyme. Cette théorie est basée sur une série d'expériences réalisées sur des cultures primaires de cellules épithéliales provenant d'individus sains et de patients mucoviscidosiques. Lorsque des bactéries sont placées sur la surface apicale de ces cellules épithéliales, les cellules saines les éliminent alors que les cellules mucoviscidosiques en sont incapables. Les bactéries ont également été placées dans le milieu de culture du côté basolatéral ; dans ce cas-ci, aucune des deux cultures n'a été capable de supprimer cette infection, suggérant que les cultures de cellules épithéliales saines produisent des facteurs apicaux capables d'éliminer les bactéries. Les chercheurs ont ensuite expérimenté l'effet du sel ; l'ajout d'eau dans le milieu produit par les cellules mucoviscidosique le rend à nouveau bactéricide alors que l'ajout de NaCl dans le milieu des cellules saines provoque la prolifération des bactéries. L'équipe de M. Welsh en a conclu que les cellules épithéliales pulmonaires saines et mucoviscidosiques sont capables de libérer des antibiotiques naturels ; cependant, la haute teneur en sel dans le liquide de surface des cellules épithéliales mucoviscidosiques les inactive (Smith et al., 1996; Zabner et al., 1998). Pour confirmer cette hypothèse, Zabner *et al.* ont mesuré la teneur en sel dans le volume de liquide situé à la surface des cellules épithéliales. Le fluide apical recouvrant les cellules normales a un taux de Na⁺ et de Cl⁻ trois fois moins élevé que dans le liquide basolatéral, ce qui indique une absorption massive de sel par ces cellules. Par opposition, le fluide des cellules mucoviscidosiques présente un taux en sel deux fois supérieur à la normale (Zabner et al., 1998).

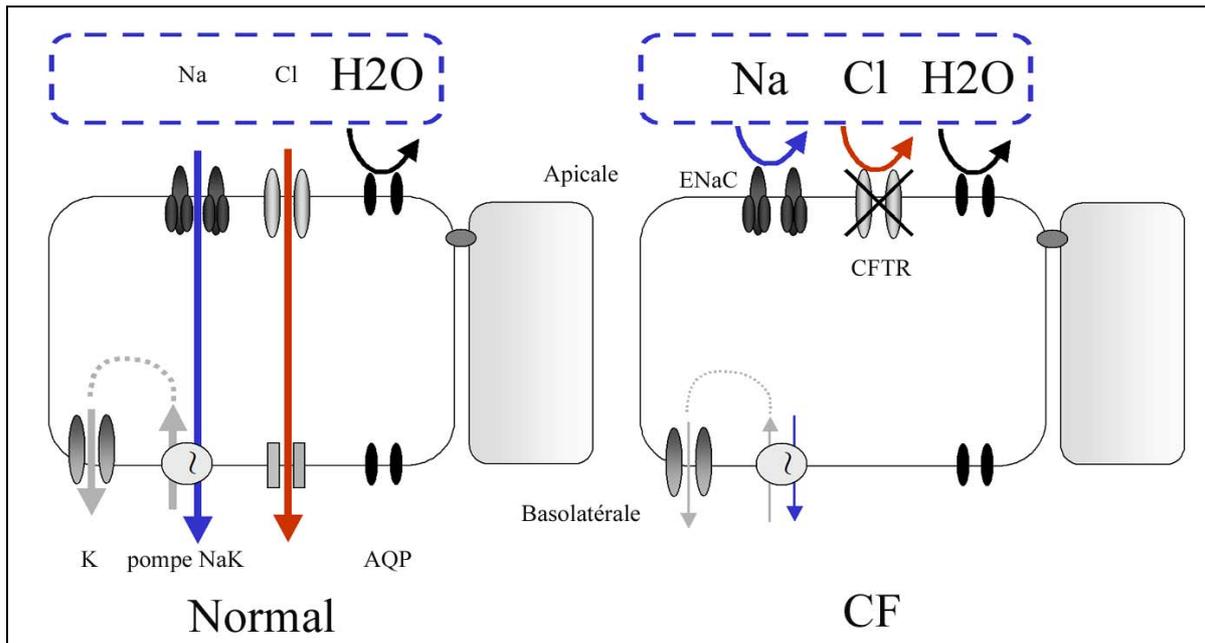


Figure 10 : L'hypothèse dite de « la concentration élevée en sels »

Cette hypothèse postule que l'épithélium respiratoire est relativement imperméable à l'eau. En situation normale, l'épithélium absorbe les sels alors qu'il est imperméable à l'eau. Dans des conditions pathologiques, l'absence de CFTR entraîne une réduction de l'absorption de ces sels conduisant à un liquide périciliaire salé qui inactive les peptides microbactériens endogènes. AQP, aquaporine.

En se basant sur des expériences similaires, Boucher et ses collègues en arrivent à une toute autre conclusion et postulent une autre théorie (Figure 11) (Matsui et al., 1998; Boucher, 2007). Bien qu'ils aient également utilisé des cultures primaires de cellules épithéliales, ils n'ont mesuré aucune différence de contenu en sel ni d'osmolarité entre les cellules normales et les cellules mucoviscidosiques. Par contre, la couche de liquide recouvrant les cultures de cellules épithéliales mucoviscidosiques était réduite et les battements ciliaires en étaient entravés. Ces résultats corroborent les données concernant l'hyperabsorption de sodium au niveau de l'épithélium mucoviscidosique (Boucher et al., 1986; Stutts et al., 1995) et appuient l'hypothèse selon laquelle une réduction de film de liquide à la surface de l'épithélium perturbe l'appareil mucociliaire et déshydrate le mucus sécrété. Cette hyperabsorption de sodium à travers l'épithélium mucoviscidosique, suivi d'une absorption d'eau, serait causée par la perte de l'effet inhibiteur du canal CFTR sur le canal ENaC. Matsui et al., ont observé une diminution de l'ordre de 30% du liquide présent à la surface des cellules mucoviscidosiques sur une période de 24 heures, sans modification de la concentration en chlore. De plus, le transport de mucus toujours actif dans le fluide recouvrant les cellules

normales, s'est arrêté après ce même laps de temps dans les cultures de cellules épithéliales mucoviscidosiques. Une analyse par microscopie électronique et confocale indique que la diminution du volume à la surface des cultures mucoviscidosiques provoque une agglutination des cils les empêchant de fonctionner correctement. Si cette hypothèse est correcte, les voies respiratoires mucoviscidosiques favorisent l'installation des pathogènes suite à une déficience de l'appareil mucociliaire. Cette hypothèse est confortée par un modèle transgénique murin sur-exprimant le canal ENaC (Mall et al., 2004). Ce modèle, suite à une hyperabsorption de sodium, démontre qu'une diminution du fluide recouvrant les cellules épithéliales produit les mêmes symptômes pulmonaires que ceux observés chez les patients mucoviscidosiques, à savoir, une obstruction des voies aériennes par le mucus, une infiltration neutrophilique, une hyperplasie des cellules de *goblet* et une incapacité à éliminer les bactéries inhalées.

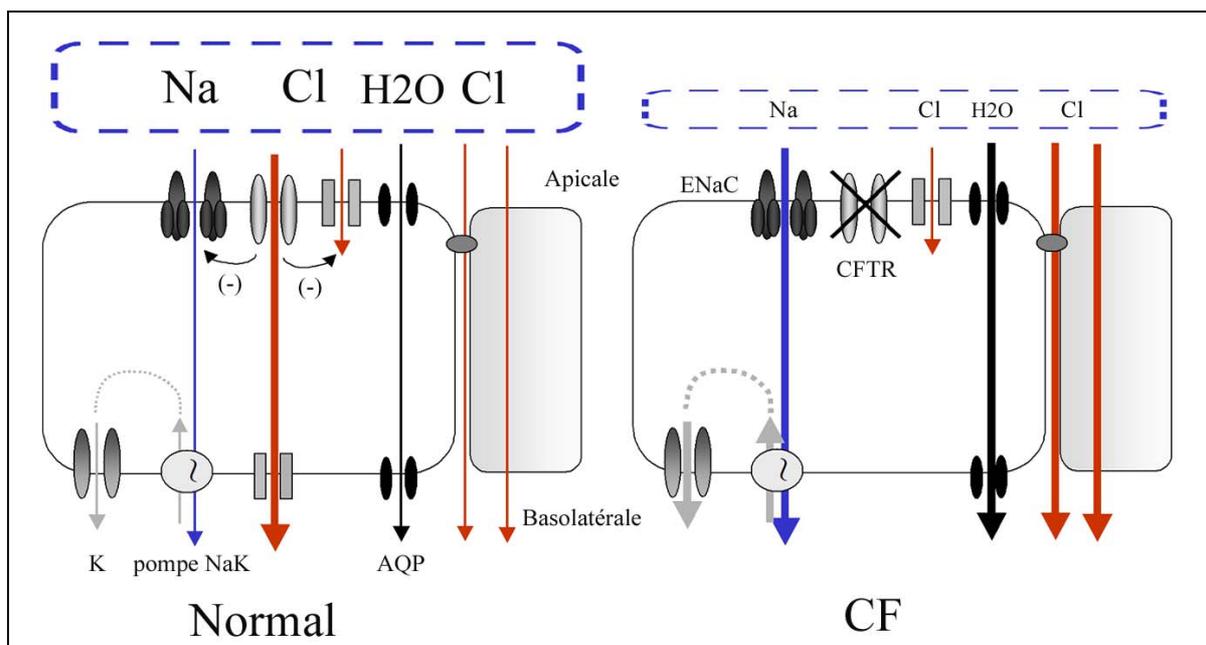


Figure 11 : Hypothèse de la déshydratation.

Cette hypothèse postule que la concentration en sel du liquide périciliaire est équivalente à celle du plasma. Chez les patients mucoviscidosiques, l'absence d'inhibition du canal ENaC par le CFTR conduit à une absorption anormalement élevée des fluides qui mène à une déplétion du liquide périciliaire et à un dysfonctionnement de l'appareil mucociliaire. AQP, aquaporine.

2.2.3. L'inflammation précoce

Ces deux hypothèses, bien que différentes, sont toutefois en accord avec la vision traditionnelle de la pathologie pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose. Dans ces deux modèles, le dysfonctionnement de CFTR comme canal à ions chlorures serait à la base du désordre pulmonaire entraînant une diminution du volume d'eau au niveau de la surface épithéliale. Cet amincissement du film de liquide à la surface des cellules épithéliales perturbe l'appareil mucociliaire et l'activité anti-microbienne. Cet environnement, en plus des obstructions bronchiques, favorise les infections bactériennes initiant ainsi une réponse inflammatoire inefficace contre ces pathogènes. Ces épisodes récurrents d'infections et d'inflammations mènent à la destruction progressive du tissu, à sa fibrose ainsi qu'à une déficience respiratoire (Pilewski and Frizzell, 1999).

Cette suite logique d'évènements est toutefois remise en cause par des études montrant qu'un processus inflammatoire pourrait survenir chez les patients atteints de mucoviscidose indépendamment de toute infection (Rao and Grigg, 2006). En effet, la présence de molécules inflammatoires avant la première infection mais également entre deux périodes de contamination, suggère un processus inflammatoire intrinsèque aux cellules épithéliales mucoviscidosiques. Ce phénomène serait amplifié par la présence de pathogènes. Cette hypothèse s'appuie sur plusieurs études. Premièrement, Hubeau *et al.* ont mis en évidence un nombre plus élevé de macrophages dans les poumons de fœtus mucoviscidosiques par rapport aux poumons de fœtus non-atteints de même âge (Hubeau et al., 2001). Deuxièmement, Pfeffer *et al.* ont montré qu'en absence d'infection, les macrophages circulant de patients mucoviscidosiques produisaient plus de TNF- α que les macrophages issus d'individus sains (Pfeffer et al., 1993). Troisièmement, Tirouvanziam *et al.* ont montré que la transplantation de tissu pulmonaire, provenant d'une souris mucoviscidosique au stade fœtal, induisait une augmentation d'IL-8 chez la souris receveuse immunodéficiente (souris SCID) (Tirouvanziam et al., 2000). De plus, des études mettent en évidence un niveau élevé de neutrophiles, d'élastase et d'interleukine-8 (IL-8) dans le lavage broncho-alvéolaire d'enfants mucoviscidosiques en bas âge n'ayant pas encore été colonisés par des bactéries (Balough et al., 1995; Khan et al., 1995; Rosenfeld et al., 2001). Une limitation à ces différentes études *in vivo* existe tout de même. En effet, ces sujets ont été sélectionnés sur base de leur état clinique respiratoire. Or, on ne peut exclure une répartition non-homogène du pathogène ou une présence de ce pathogène sous le seuil de détection mais suffisante pour induire une réponse inflammatoire. Bien que le débat sur un processus inflammatoire intrinsèque reste sujet à

discussion, les spécialistes de la mucoviscidose s'accordent à dire qu'en réponse aux infections bactériennes, l'inflammation dans les voies respiratoires des patients atteints par cette maladie est exacerbée.

2.2.4. Rôle des neutrophiles dans la mucoviscidose

La principale cause de mortalité chez les patients mucoviscidosiques est la pathologie respiratoire qui se caractérise par le développement progressif d'une insuffisance respiratoire chronique causée par l'inflammation à dominante neutrophile et par les infections bronchiques récurrentes (Balough et al., 1995; Khan et al., 1995; Chmiel and Davis, 2003; Davis, 2006; Tabary et al., 2006). Un nombre croissant d'évidences a émergé supportant l'idée que la protéine CFTR mutée contribue, non seulement, à la déplétion du volume de liquide préciliaire et à l'augmentation de la propension aux infections pulmonaires mais également à la dérégulation de la réponse inflammatoire dans les poumons de patients mucoviscidosiques (DiMango et al., 1998; Venkatakrishnan et al., 2000; Weber et al., 2001). En effet, malgré la présence de neutrophiles aux sites d'infection, les voies respiratoires sont rapidement colonisées par des pathogènes, suggérant que les neutrophiles pulmonaires mucoviscidosiques sont moins efficaces dans leur capacité à combattre les agents infectieux.

Les neutrophiles, acteurs principaux de la réponse immunitaire innée, jouent un rôle essentiel dans la phagocytose des agents infectieux mais également dans le contrôle de la croissance microbienne en libérant des cytokines pro-inflammatoires, des protéases et des espèces réactives de l'oxygène (Conese et al., 2003; Watt et al., 2005). En réponse au TNF- α , les neutrophiles sont recrutés aux sites d'infection suite à la sur-expression de ICAM-1 sur les cellules endothéliales. Par exemple, ICAM-1 est capable d'interagir avec l'intégrine β 2 présente sur les neutrophiles, ce qui permet aux neutrophiles d'adhérer aux cellules endothéliales et d'infiltrer les tissus par le processus de diapédèse (Morris et al., 2005). Lorsque la réponse inflammatoire touche à sa fin, les neutrophiles subissent une mort cellulaire programmée, ce qui permet d'éviter d'endommager les tissus avoisinants par une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène et d'enzymes protéolytiques.

Chez les patients mucoviscidosiques, les neutrophiles pulmonaires présentent de nombreuses anomalies tant au niveau de leur activation, que dans leur capacité à phagocyter et à entrer en apoptose. L'IL-8 est le principal chimio-attractant des neutrophiles dans les poumons mucoviscidosiques. Elle est synthétisée par de nombreux types cellulaires tels que les macrophages alvéolaires, les cellules épithéliales bronchiques, les fibroblastes mais

également par les neutrophiles eux-mêmes (Conese et al., 2003; Terheggen-Lagro et al., 2005). Différentes études ont montré que les neutrophiles mucoviscidosiques secrétaient une quantité plus importante d'IL-8 que les neutrophiles de patients sains. Cependant, le nombre de récepteurs à l'IL-8 à la surface des neutrophiles est fortement réduit par rapport à un neutrophile non-mucoviscidosique. Cette diminution implique que le chimiotactisme des neutrophiles par les produits bactériens est moins efficace et donc contribue à la persistance et à la pathogénèse des infections bactériennes chroniques chez les patients mucoviscidosiques (Conese et al., 2003). Corvol et ses collaborateurs ont également observé que l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires par les neutrophiles s'accompagnait d'une diminution de production de molécules anti-inflammatoires comme le récepteur antagoniste à l'IL-1 (IL-1ra) ou l'IL-10 (Corvol et al., 2003; Saadane et al., 2005). De plus, ces mêmes neutrophiles produisent plus d'élastase, plus d'espèces réactives de l'oxygène et ont une activité myeloperoxydase supérieure à celle mesurée dans les neutrophiles de personnes saines. Ce déséquilibre enzymatique contribue à la destruction des tissus avoisinants. En effet, l'élastase, produite en réponse au TNF et à l'IL-8 (Taggart et al., 2000), est capable de dégrader les protéines de structure de la matrice telles que l'élastine, le collagène et les protéoglycans. Elle agit également sur la sécrétion de mucus par les cellules glandulaires séreuses et inhibe les battements ciliaires. L'élastase facilite également la persistance des infections en clivant les immunoglobulines, les composants du complément et les récepteurs servant à l'opsonisation. Ces différents effets ont un impact sur la phagocytose mais également sur l'élimination des bactéries favorisant l'obstruction des voies respiratoires des patients mucoviscidosiques (Tosi et al., 1990). Un dernier phénomène contribuant à la persistance de la réponse inflammatoire est le délai d'apoptose observé chez les neutrophiles mucoviscidosiques. En effet, *P. aeruginosa* et *S. aureus* stimulent la sécrétion du G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*) et du GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) par les cellules épithéliales. Or, ces cytokines ainsi que l'IL-8 retardent l'apoptose des neutrophiles (Conese et al., 2003; Watt et al., 2005).

3. Les facteurs de transcription

3.1. NF- κ B

3.1.1. La famille NF- κ B

NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) a été identifié en 1986 comme étant un complexe protéique se liant à une séquence d'ADN décamérique dénommée site κ B localisée au niveau de l'enhancer du gène codant pour la chaîne légère kappa des immunoglobulines (Sen and Baltimore, 1986). NF- κ B est un facteur de transcription dimérique formé de protéines structurellement proches. Ces protéines ont en commun une région conservée de 300 acides aminés appelée le domaine Rel, indispensable à leur dimérisation, à leur localisation nucléaire et à leur liaison à l'ADN. Chez les mammifères, la famille NF- κ B est composée de cinq membres répartis en deux groupes sur base de leur structure générale et de leur processing (Figure 12) : le premier groupe comprend les protéines « NF- κ B » (p50/p105 et p52/p100) et le deuxième groupe comprend les protéines « Rel » (p65/RelA, RelB et c-Rel). Les protéines NF- κ B, p50 et p52, sont générées suite à un clivage protéolytique de leur précurseur p105 et p100, respectivement. Alors que les protéines p65/RelA, RelB et c-Rel contiennent un domaine C-terminal de transactivation, p50 et p52 en sont dépourvus. Toutefois, ces deux sous-unités sont capables de former des hétérodimères avec d'autres sous-unités en fournissant une grande spécificité de liaison à l'ADN. Bien que la plupart des combinaisons existent, p50/p65 est le dimère le plus fréquemment rencontré (Basseres and Baldwin, 2006; Gilmore, 2006; Hayden et al., 2006).

Figure 12 : Membres de la famille NF- κ B. D'après Perkins, 2006.

p50 et p52 sont présentés sur leur forme de précurseurs p105 et p100, respectivement. RHD, Rel homology domain ; TAD, transcriptional activation domain ; DD, death domain ; ANK, ankyrin-repeat motifs ; LZ, Leucine-Zipper motif.

3.1.2. La famille I κ B

En l'absence de stimuli induisant son activation, le dimère NF- κ B est maintenu sous une forme inactive suite à son association avec des protéines inhibitrices de la famille I κ B qui sont au nombre de 7 (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B ζ , p100, p105 et Bcl-3). La caractéristique de cette famille est la présence d'un domaine de répétitions de motifs dit « ankyrine », du nom de la protéine érythrocytaire Ankyrine qui présente ce type de répétitions (Figure 13). Ce motif est responsable de l'interaction des protéines I κ B avec le domaine Rel des membres de la famille NF- κ B. Il résulte de cette interaction une séquestration de NF- κ B dans le cytoplasme l'empêchant ainsi d'activer la transcription de ses gènes cibles (Basseres and Baldwin, 2006; Gilmore, 2006; Hayden et al., 2006). Il faut noter que contrairement aux autres membres de la famille I κ B, Bcl-3 ne retient pas le dimère NF- κ B dans le cytoplasme mais régule de manière positive la transcription des gènes en agissant comme un co-activateur transcriptionnel pour les dimères p50/p50 ou p52/p52 liant l'ADN (Bours et al., 1993; Fujita et al., 1993).

Figure 13 : Membres de la famille I κ B. D'après Perkins, 2006.

PEST, Région riche en résidus proline (P), glutamate (E), sérine (S), thréonine (T); ANK, motif riche en répétition ankyrine.

3.1.3. Voies d'activation de NF- κ B

NF- κ B est activé par une variété de stimuli différents (Figure 14) incluant des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 β , des agents infectieux bactériens (LPS), parasitaires ou viraux, des mitogènes et des stress physiques et chimiques (Viatour et al., 2005; Karin, 2006).

La plupart des stimuli conduisent à l'activation du complexe IKK (I κ B Kinase) qui comprend trois sous-unités : IKK α , IKK β et IKK γ ou NEMO (*NF- κ B Essential Modulator*). IKK α et β sont les sous-unités catalytiques inductibles, alors que IKK γ est une protéine régulatrice, dépourvue d'activité kinase. En fonction du stimulus, plusieurs voies d'activation sont possibles, impliquant l'une ou l'autre sous-unité IKK conduisant à l'activation des sous-unités NF- κ B cibles.

La voie classique, principalement activée par les cytokines inflammatoires et les LPS, mène à l'activation du complexe IKK. IKK β phosphoryle I κ B- α (inhibiteur le plus fréquent) sur les sérines 32 et 36. Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitination des lysines 21 et 22 suivie de la dégradation de l'inhibiteur par le protéasome 26S. Les complexes NF- κ B libérés s'accumulent dans le noyau où ils lient leurs séquences ADN cibles et régulent ainsi l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire, dans le contrôle de la croissance cellulaire et dans la régulation de la survie cellulaire. Un de ces gènes cibles est I κ B- α qui, une fois synthétisé, migre dans le noyau et se lie à NF- κ B. Grâce au signal d'export nucléaire de I κ B- α , le complexe I κ B- α /NF- κ B retourne dans le cytoplasme jusqu'au prochain stimulus.

La seconde voie, la voie alternative, est NEMO-indépendante et elle est activée principalement par la lymphotoxine β , BAFF (*B-cell Activating Factor*), le ligand CD40 ou par certains virus tels que le virus Epstein-Barr (Dejardin et al., 2002). Ces stimuli induisent la phosphorylation de l'homodimère IKK α , qui à son tour phosphoryle p100. Ce précurseur est ensuite ubiquitiné et clivé pour générer la sous-unité p52 qui dimérise avec RelB avant de migrer dans le noyau et d'activer ses gènes cibles.

Enfin, certains stimuli induisent une activation atypique de NF- κ B : ces stimuli (UV, pervanadate de sodium, H₂O₂) peuvent permettre la libération de NF- κ B sans pour autant impliquer le complexe IKK et la dégradation de I κ B- α (Schoonbroodt et al., 2000; Viatour et al., 2005; Basseres and Baldwin, 2006; Gilmore, 2006; Hayden et al., 2006; Scheidereit, 2006).

Figure 14: Voies d'activation classique et alternative de NF- κ B. D'après Gilmore, 2006.

3.1.4. Gènes cibles de NF- κ B

En 2007, plus de 450 gènes sont connus pour être régulés par NF- κ B (www.nf-kb.org). Parmi ceux-ci on peut citer de nombreuses cytokines (TNF α et β , IL-1, IL-2, IL-6...), des chimiokines (IL-8, Gro α , β , γ ,...), des facteurs de croissances (VEGF, PDGF, PLGF,...), des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1...), des enzymes impliquées dans la réponse au stress (NO synthase inductible, phospholipase A2, COX-2...) ainsi que des protéines impliquées dans la présentation d'antigène. Certains gènes anti-apoptotiques (A1, c-IAP-1, c-IAP-2, Bcl-X_L ...) sont également sous la dépendance de NF- κ B. NF- κ B joue donc un rôle capital dans la réponse immunitaire et inflammatoire ainsi que dans l'apoptose, le développement et la réplication de certains virus.

3.1.5. NF- κ B et l'inflammation

NF- κ B joue un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire. Son implication dans des maladies inflammatoires chroniques telles que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies pulmonaires obstructives chroniques ou la mucoviscidose, a largement été étudiée (Barnes and Adcock, 1998; DiMango et al., 1998; Venkatakrisnan et al., 2000; Tabary et al., 2001; Adcock et al., 2006; Barnes, 2006; Rannou et al., 2006). En effet, NF- κ B induit la transcription de nombreux gènes codant pour des cytokines et des chimiokines. L'endothélium vasculaire est la première cible de ces effecteurs qui, grâce à ces signaux, recrute les leucocytes sur le lieu de l'infection. Ceux-ci sortent de la circulation sanguine grâce à l'intervention de NF- κ B qui régule également l'expression des molécules d'adhésion présentes sur les leucocytes et sur les cellules endothéliales. La présence des neutrophiles est indispensable pour l'élimination des agents pathogènes, or, c'est encore NF- κ B qui régule l'expression des enzymes qui génèrent les prostaglandines et les espèces réactives de l'oxygène (exemple : COX-2 et la NOS inductible). C'est également lui qui permet aux neutrophiles de survivre dans des conditions relativement toxiques en retardant leur apoptose. Finalement, il régule l'expression des MMPs qui sont des médiateurs cruciaux de l'inflammation locale et du chimotactisme des leucocytes (Hayden et al., 2006).

3.1.6. Les inhibiteurs de NF- κ B

Puisqu'un grand nombre de processus cellulaires sont affectés par NF- κ B, l'identification d'inhibiteurs spécifiques est devenue la priorité de beaucoup de chercheurs et de compagnies pharmaceutiques. En raison du nombre important d'inducteurs et de niveaux de régulation de NF- κ B (www.nf-kb.org), les inhibiteurs sont très nombreux et font partie d'une large variété de molécules agissant soit très précocement (ex : inhibition la réaction ligand-récepteur), soit en modulant la voie quand NF- κ B est encore cytoplasmique (ex : inhibition du complexe IKK, inhibition de la dégradation de I κ B α) ou encore en inhibant l'activité nucléaire de NF- κ B (ex : inhibition de sa translocation, de sa liaison à l'ADN). Le nombre d'inhibiteurs de la voie NF- κ B ne cesse d'augmenter. Actuellement, 785 inhibiteurs ont été recensés (Gilmore and Herscovitch, 2006). Ceux-ci sont classés selon leur nature et l'étape à laquelle ils inhibent la voie d'activation NF- κ B (Figure 15).

Figure 15 : Niveau d'action des différents inhibiteurs de la voie de transduction de NF- κ B. D'après Gilmore, 2006.

Parmi ces inhibiteurs, on retrouve des agents anti-inflammatoires non-stéroïdiens comme l'aspirine qui agissent sur la synthèse de prostaglandines via l'inactivation de la cycloxygénase et inhibent les IKKs. D'autres anti-inflammatoires tels que le sulindac ou l'ibuprofen agissent également sur les IKKs mais aussi sur la dégradation d'I κ B- α . Les glucocorticoïdes sont également connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Ils inhibent l'activation de NF- κ B en se liant directement avec p65 ou en induisant la transcription de I κ B- α . En effet, l'augmentation de la quantité d'I κ B- α permet de maintenir NF- κ B dans le cytoplasme (Olivier et al., 2006).

L'utilisation de ces inhibiteurs n'est pas aisée et sans effets secondaires. En effet, certains inhibiteurs ont une action sur des mécanismes généraux tels que les glucocorticoïdes ou les inhibiteurs du protéasome (PS-341), ce qui signifie que des voies autres que NF- κ B sont perturbées et donc que ces inhibiteurs pourraient provoquer des effets indésirables. De plus, NF- κ B, bien qu'il soit constitutivement activé dans certaines pathologies, n'en reste pas

moins indispensable dans la réponse immunitaire. Toutefois, le PS-341 encore appelé bortezomib a fait ses preuves dans de nombreuses études cliniques luttant contre cancer. En effet, l'utilisation de ce médicament permet d'inhiber la prolifération et/ou d'induire l'apoptose des cellules issues de tumeurs diverses (Olivier et al., 2006)

3.2. AP-1

3.2.1. La famille AP-1

AP-1 (*Activator protein-1*) est un des premiers facteurs de transcription à avoir été identifié chez les mammifères (Angel et al., 1987; Lee et al., 1987) ; cependant ses fonctions physiologiques n'ont été que partiellement élucidées. AP-1 est un facteur de transcription dimérique dont les sous-unités sont des protéines contenant des régions à « fermeture éclair » et riches en résidus basiques (bZIP). Ces protéines appartiennent aux sous-familles Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos [c-Fos, FosB, Fra-1 (*Fos Related Antigen*) et Fra2], Maf [*Musculoaponeurotic Fibrosarcoma* (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K et Nrl)] et ATF (*Activating Transcription Factor*) [ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1 (*Jun-dimerizing Partner*) et JDP2] (Shaulian and Karin, 2002; Eferl and Wagner, 2003). Avec l'identification d'un nombre croissant de protéines bZIP qui peuvent former des dimères stables, le nombre de combinaisons possibles s'élève à 18 (Kundu et al., 2006). Parmi toutes ces protéines, les sous-unités c-Jun et c-Fos sont les plus souvent étudiées. Les protéines Jun sont capables de former des homodimères stables qui lient des éléments de réponse au 12-O-tetradecanoylphorbol (TPA, 5'-TGAG/CTCA-3') aussi connu sous le nom de TRE (élément de réponse au TPA). Par contre, les membres de la famille Fos ne peuvent former des homodimères mais ils s'associent avec les protéines Jun pour former des hétérodimères qui sont beaucoup plus stables que les homodimères Jun-Jun. Les protéines ATF sont elles aussi capables de former des homodimères et des hétérodimères avec les protéines Jun. Cependant, ces hétérodimères ATF/Jun lient préférentiellement des éléments de réponse à l'AMP cyclique (CRE, 5'-TGACGTCA-3') (Karin et al., 1997; Shaulian and Karin, 2002; Kundu et al., 2006).

3.2.2. Régulation de l'activité de AP-1

Contrairement à NF- κ B, AP-1 est un facteur de transcription nucléaire (Karin et al., 2001). La régulation de son activité est très complexe et peut se faire à différents niveaux :

premièrement, régulation de la transcription des gènes *c-jun* et *c-fos* et de la stabilité de leurs ARNs messagers; deuxièmement, modifications du temps de demi-vie des protéines Jun et Fos ; troisièmement, modifications post-transcriptionnelles des sous-unités Jun et Fos afin de moduler leur potentiel transactivateur ; quatrièmement, interactions avec d'autres facteurs de transcriptions qui peuvent induire soit une synergie soit interférer avec l'activité de AP-1 (Shaulian and Karin, 2002).

Régulation transcriptionnelle de l'activité AP-1

La plupart des gènes qui codent pour des composants de AP-1 sont des gènes dont la transcription est induite très rapidement après stimulation cellulaire. Parmi ces gènes, la régulation de la transcription de *c-fos* et de *c-jun* est la mieux étudiée. L'activité de AP-1 est induite par un grand nombre de stimuli tels que des facteurs de croissance, des cytokines, des neurotransmetteurs, des hormones, des interactions cellules-matrice, des infections bactériennes et virales ainsi qu'une variété de stress physiques et chimiques (Figure 16). Ces stimuli activent la cascade des MAP kinases (MAPK, *Mitogen Activated Protein Kinase*) qui induit l'activité de AP-1 par phosphorylation de substrats distincts. Les MAPK sont des sérines-thréonines kinases qui sont phosphorylées séquentiellement par des kinases situées en amont (MAPKKK, MAPKK). Elles sont subdivisées en trois voies de signalisation : ERK (*Extracellular-signal-Regulated Kinase*), JNK1/2/3 (*c-Jun N-terminal Kinase*), et p38. L'activité de ces kinases est modulée par la présence de phosphatases (Shaulian and Karin, 2002). Le sérum et les facteurs de croissance induisent l'activation de AP-1 en activant la MAPK ERK. Celle-ci migre dans le noyau afin de phosphoryler et de potentialiser l'activité transcriptionnelle de TCF (*Ternary Complex Factors*) qui se lie sur le promoteur de *c-fos*. De plus, ERK peut également phosphoryler directement les sous-unités Fra1 et Fra2, augmentant leur activité de liaison à l'ADN en association avec c-Jun. La régulation de la transcription de *c-jun* fait suite à des stimuli très variés (cytokines pro-inflammatoires et stress génotoxiques) qui opèrent via l'élément de réponse TRE. Toutefois, la plupart des types cellulaires exprime la protéine c-Jun en faible quantité en absence de stimulation. La phosphorylation de c-Jun stimule sa capacité à activer la transcription, induisant ainsi sa propre transcription (Karin and Hunter, 1995; Shaulian and Karin, 2002).

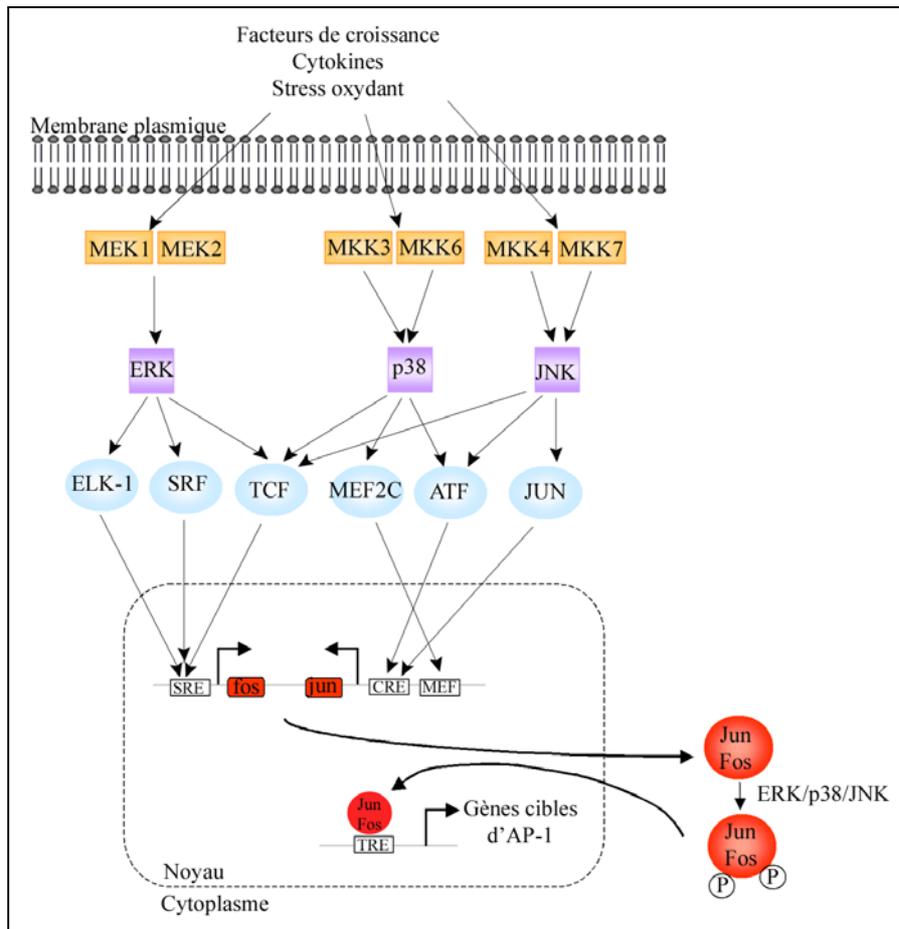


Figure 16 : Régulation transcriptionnelle et par phosphorylation de l'activité de AP-1.

MEK, extracellular signal-regulated protein kinase kinase ; *MKK*, mitogen-activated protein kinase kinase ; *ERK*, extracellular signal-regulated protein kinase ; *JNK*, c-Jun N-terminal kinase ; *ELK*, ETS-like kinase ; *SRF*, serum response factor ; *TCF*, ternary-complex factor ; *MEF*, myocyte-specific enhancer factor ; *ATF*, activating transcription factor.

Régulation post-transcriptionnelle de l'activité de AP-1

Une régulation post-transcriptionnelle existe également. Les ARNs messagers de *c-jun* et de *c-fos* deviennent plus stables en réponse à certains stimuli tels que les UV, ce qui permet d'accroître l'activité AP-1 en augmentant l'expression des sous-unités c-Jun et c-Fos (Blattner et al., 2000).

Régulation post-traductionnelle de l'activité de AP-1

L'activité des sous-unités de AP-1 est modulée par le biais de phosphorylations. Dans le cas de c-Jun, la phosphorylation des sérines 63 et 73, localisées dans son domaine transactivateur, potentialise sa capacité à activer la transcription soit en temps qu'homodimère soit en temps qu'hétérodimère avec c-Fos. Ces résidus, qui n'affectent pas sa capacité de liaison à l'ADN, sont principalement phosphorylés par la JNK. Par contre, les kinases ERK1/2 ne phosphorylent pas les résidus en position N-terminale mais bien un site localisé du

côté C-terminal du domaine de liaison à l'ADN de c-Jun (Karin and Hunter, 1995; Karin et al., 1997). La phosphorylation de c-Jun peut également accroître son activité transcriptionnelle par l'intermédiaire d'interaction avec d'autres facteurs de transcription tels que CBP (*CREB Binding Protein*) (Arias et al., 1994; Kwok et al., 1994), NF-AT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) (Macian et al., 2001) et Smad (Zhang et al., 1998; Verrecchia et al., 2001).

La régulation des protéines Fos est beaucoup moins étudiée. La protéine c-Fos se caractérise par une instabilité élevée dont les mécanismes sont peu connus, cependant, il semblerait que la phosphorylation de c-Fos au niveau de la thréonine 232, homologue de la sérine 73 de c-Jun, augmente sa stabilité et son pouvoir transactivateur. Dans le contexte d'un hétérodimère c-Jun/c-Fos, la phosphorylation de chacune des sous-unités permettrait d'augmenter, de manière égale, leur pouvoir transactivateur suggérant que les deux domaines d'activation interagissent avec la machinerie transcriptionnelle (Deng and Karin, 1994).

A côté de tous ces signaux activateurs de AP-1, il existe des mécanismes inhibiteurs. En effet, les récepteurs nucléaires NR, sont capables d'interagir directement avec les sous-unités de AP-1, les empêchant ainsi d'interagir avec le promoteur de leurs gènes cibles (Pascual and Glass, 2006).

3.2.3. Gènes cibles de AP-1

AP-1 régule un nombre varié de processus incluant la prolifération cellulaire, la survie, l'apoptose, la différenciation cellulaire et plus récemment l'inflammation (Mossman et al., 2006). Les sous-unités c-Jun et c-Fos ont été identifiées chez les mammifères par homologie avec les onco-protéines virale v-Jun et v-Fos. Pour cette raison, ces deux sous-unités ont rapidement été reliées aux processus de tumorigenèse. Par conséquent, les études visant à identifier des nouveaux gènes AP-1-dépendant, se sont concentrées principalement sur des gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire (Cyclin D1, p21, p16, p53, FasL, Fas, Bcl3,...) (Shaulian and Karin, 2001; Shaulian and Karin, 2002). Depuis peu, on sait que AP-1 est également impliqué dans l'inflammation suite à la découverte de sites AP-1 dans le promoteur de nombreux gènes codant pour des cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α ,...) (Fan et al., 2004; Kida et al., 2005; Yoshimura et al., 2006), des métalloprotéases (MMP-1, MMP3,...) (Chinenov and Kerppola, 2001; Rannou et al., 2006), des chimiokines (IL-8, RANTES,...) (Sebkova et al., 2004), des molécules d'adhésion (ICAM-1, intégrines,...) (Berrou and Bryckaert, 2001) ou encore des enzymes telles que COX-2 (Kundu et al., 2006).

3.2.4. AP-1 et l'inflammation

Bien qu'AP-1 soit plus largement connu pour jouer un rôle dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire, son implication dans la réponse inflammatoire devient de plus en plus évidente. En effet, AP-1 est activé dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques comme l'asthme, l'arthrite rhumatoïde ou les maladies pulmonaires obstructives chroniques (Barnes and Adcock, 1998; Nguyen et al., 2003; Fan et al., 2004; Barnes, 2006; Rannou et al., 2006; Thompson et al., 2006). Par contre, l'évidence de son implication dans la mucoviscidose est toute récente (Cigana et al., 2006). Dans cette étude, une activation constitutive de AP-1 a été observée dans une lignée de cellules épithéliales bronchiques dépourvue de protéine CFTR.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

La cause majeure de décès chez les patients atteints de mucoviscidose est la déficience respiratoire engendrée par les cycles récurrents d'infection et d'inflammation pulmonaire. La colonisation des voies respiratoires par des pathogènes spécifiques commence dès les premiers mois de la vie, favorisée par un mucus visqueux et une déficience de l'appareil mucociliaire. Ces infections sont, sans conteste, à l'origine d'une réaction inflammatoire dans les poumons des patients mucoviscidosiques. Toutefois, la question reste ouverte quant à la présence d'un processus inflammatoire avant même toute infection.

Le but de ce travail a été de mettre en évidence la présence d'un état inflammatoire précoce, causé par le dysfonctionnement du canal CFTR dans les cellules épithéliales et d'étudier les mécanismes moléculaires conduisant à ce processus inflammatoire.

Au cours de la première partie de ce travail, nous avons étudié la présence de marqueurs pro-inflammatoires dans les voies respiratoires d'un fœtus de 24 semaines, donc non colonisé par des agents pathogènes.

Durant la seconde partie de ce travail, nous avons étudié l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1, tous deux impliqués dans les processus inflammatoires, dans différents modèles de cellules mucoviscidosiques. Après avoir mis en évidence une activité constitutive de NF- κ B et de AP-1 dans les cellules mucoviscidosiques, nous avons tenté de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de ces activations.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons voulu démontrer que la mutation Δ F508 était capable, non seulement d'induire un processus inflammatoire mais également d'autres processus contribuant à la détérioration des voies respiratoires tels que l'angiogenèse.

La mise en évidence d'un processus inflammatoire intrinsèque lié à la simple présence d'une mutation dans le gène *Cftr*, conduirait à modifier le traitement suivi par les patients atteints de mucoviscidose. En effet, ces données suggéreraient l'utilisation de traitements anti-inflammatoires tout au long de leur vie afin de retarder les effets délétères de ce processus inflammatoire sur les voies respiratoires.

RESULTATS

1. Article N°1

Verhaeghe C, Delbecque K, de Leval L, Oury C, Bours V. **Early Inflammation in airways of a cystic fibrosis foetus.** *J. Cyst. Fibros.* (2007). In Press

1.1. Contexte

La majorité des patients souffrant de la mucoviscidose succombent à une détresse respiratoire provoquée par les infections bactériennes chroniques et les réactions inflammatoires qui en découlent. La présence d'un processus inflammatoire est souvent considérée comme secondaire à l'infection ; cependant, depuis maintenant une dizaine d'années, des études suggèrent qu'un processus inflammatoire puisse également avoir lieu indépendamment de toute infection (Pfeffer et al., 1993; Balough et al., 1995; Khan et al., 1995; Noah et al., 1997). En effet, d'après ces études, les enfants mucoviscidosiques présentent un nombre plus élevé de neutrophiles ainsi qu'une concentration en IL-8, en élastase et en leucotriènes B4 plus importante dans leurs lavages broncho-alvéolaires que dans ceux d'enfants sains. A l'heure actuelle, ces résultats restent sujet à discussion. En effet, il reste toujours un doute sur une présence éventuelle de pathogènes selon les méthodes d'analyses utilisées. En effet, différentes études ont été réalisées sur des enfants âgés de moins d'un an ; or, il est admis que la première infection se passe dès les premiers mois de vie des enfants atteints de mucoviscidose. Ce qui suggère que les résultats de ces précédentes études pourraient être biaisés par la présence d'agents infectieux non détectés au moment des prélèvements. Cette théorie est en partie appuyée par les études d'Armstrong et ses collègues qui ont montré qu'il n'existait aucune différence dans le taux de neutrophiles ni dans la concentration en médiateurs pro-inflammatoires mesurée dans les lavages broncho-alvéolaires d'enfants mucoviscidosiques et sains après avoir écarté de l'étude tous les enfants présentant le moindre signe d'infection (Armstrong et al., 1997; Armstrong et al., 2005).

1.2. Résultats

Afin de déterminer si un processus inflammatoire existe en absence de tout pathogène, nous avons étudié, grâce à une collaboration avec le Dr Delbecque (Service d'Anatomie Pathologie du CHU de Liège), le niveau d'expression de molécules pro-inflammatoires dans les poumons d'un fœtus de 24 semaines, homozygote pour la mutation $\Delta F508$ (CF) ainsi que

dans les poumons de deux fœtus (âgés de 22 et 23 semaines) non-mucoviscidosiques (non-CF). Puisque qu'une des caractéristiques principales de la mucoviscidose est l'infiltration de neutrophiles dans les tissus, nous avons choisi d'étudier le niveau d'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 et celui des chimiokines Gro β et Gro- γ , toutes trois impliquées dans l'extravasation et l'attraction des neutrophiles (Rollins, 1997; Guo and Ward, 2002). Nous avons également regardé le niveau d'expression de l'enzyme COX-2, dont le rôle est largement connu dans les maladies inflammatoires (Kuwano et al., 2004; Cox et al., 2005; Park and Christman, 2006) et celui de la MMP-1, métalloprotéase impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire des voies respiratoires. Ces cinq marqueurs pro-inflammatoires ont été analysés par immunohistochimie. A l'exception de Gro- β qui ne présente aucune différence, le niveau d'expression des protéines ICAM-1, Gro- γ , COX-2 et MMP-1 est supérieur dans les poumons du fœtus CF par rapport à celui observé dans les poumons des fœtus non-CF. Alors que la sur-expression de ICAM-1 et de COX-2 est visible dans les cellules épithéliales bronchiques, Gro- γ est principalement sur-exprimé par les cellules endothéliales et les monocytes et MMP-1 par les cellules cartilagineuses.

Les protéines pro-inflammatoires Gro- γ , ICAM-1, COX-2 et MMP-1 sont connues pour être sous le contrôle du facteur de transcription NF- κ B. Nous avons dès lors entrepris d'étudier par immunofluorescence, la localisation de la sous-unité p65 dans les cellules épithéliales bronchiques des différents fœtus. Alors qu'aucune trace de fluorescence n'est visible dans les noyaux des cellules épithéliales des fœtus contrôles, nous pouvons observer que les noyaux des cellules épithéliales sont fluorescents, indiquant une translocation de la sous-unité p65 du cytoplasme vers le noyau et une possible activation du facteur de transcription NF- κ B.

Ces résultats suggèrent que les poumons de fœtus mucoviscidosiques sont capables de sécréter des molécules inflammatoires et ceci notamment suite à une activation du facteur de transcription NF- κ B.

1.3. Conclusion

La mise en évidence d'une expression accrue de molécules pro-inflammatoires, déjà identifiées dans le cadre de maladies inflammatoires telles que l'asthme et les maladies pulmonaires obstructives chroniques, indique qu'un processus inflammatoire est initié très précocement et en absence de toute infection. Cet état inflammatoire est également indépendant des cellules immunitaires puisque nous n'avons observé aucune infiltration

neutrophilique et que ces marqueurs pro-inflammatoires sont majoritairement produits par les cellules épithéliales, endothéliales et cartilagineuses. Ces résultats sont en faveur d'un processus inflammatoire intrinsèque lié à la mutation du gène *Cftr*. Ce phénomène d'inflammation précoce résultant d'une activation constitutive du facteur de transcription NF- κ B dans les cellules épithéliales est probablement léger ; cependant, les répercussions de ce processus inflammatoire, commençant dès la période fœtale, peuvent devenir considérables après la naissance suite au contact avec des agents infectieux.

2. Article N°2:

Verhaeghe C, Remouchamps C, Hennuy B, Vanderplasschen A, Chariot A, Tabruyn SP, Oury C, Bours V. **Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways.** *Biochem Pharmacol.* (2007). In Press.

2.1. Contexte

La production de molécules pro-inflammatoires par les cellules épithéliales d'un fœtus homozygote pour la mutation $\Delta F508$, nous a conduit à vouloir comprendre le lien entre cette mutation l'expression de ces molécules. La rareté de ce type de matériel ne nous a pas permis d'explorer plus en détail ce phénomène inflammatoire sur les poumons d'un fœtus mucoviscidosique humain. C'est pourquoi, la deuxième partie de ce travail a été consacrée à l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la production de molécules pro-inflammatoires dans différents modèles de cellules mucoviscidosique en l'absence de toute stimulation.

Deux facteurs de transcription connus pour jouer un rôle essentiel dans le processus inflammatoire sont NF- κ B et AP-1. Une activité accrue de ces deux facteurs de transcription a déjà été observée dans différentes pathologies pulmonaires telles que l'asthme (Barnes and Adcock, 1998; Nguyen et al., 2003; Wright and Christman, 2003; Couetil et al., 2006) et les maladies pulmonaires obstructives chroniques (Laan et al., 2004; Brody and Spira, 2006; Rahman and Adcock, 2006). Dans le cadre de la mucoviscidose, une activité constitutive de NF- κ B a également été observée dans différents modèles de cultures cellulaires (cultures primaires, cellules pulmonaires immortalisées, cellules transfectées stablement,...) (Tabary et al., 2000; Venkatakrisnan et al., 2000; Tabary et al., 2001; Knorre et al., 2002). Cependant, la voie menant à cette activation ainsi que les gènes sous sa dépendance n'ont pas été identifiés à l'exception de l'IL-8 (Tabary et al., 1998; Tabary et al., 2001; Becker et al., 2004; Zaman et al., 2004; Saadane et al., 2007). Contrairement à NF- κ B, une seule étude a mis récemment en évidence une activation de AP-1, en absence de tout pathogène, dans une lignée de cellules épithéliales bronchiques dépourvue de CFTR (Cigana et al., 2006). Une fois encore, la voie d'activation de AP-1 dans les cellules mucoviscidosiques ainsi que les gènes sous sa dépendance n'ont pas encore été élucidés.

2.2. Résultats

Afin de confirmer la présence d'une réponse inflammatoire au cours de la vie fœtale, nous avons choisi de travailler avec deux lignées de cellules épithéliales de trachée, issues soit d'un fœtus homozygote pour la mutation $\Delta F508$ (cellules CFT-2) soit d'un fœtus non-atteint de mucoviscidose (cellules NT-1). Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence une capacité de liaison à l'ADN ainsi qu'une activité transcriptionnelle plus importante de NF- κ B et de AP-1 dans des cellules CFT-2 par rapport aux cellules contrôles NT-1. Afin de pouvoir établir un lien direct entre la présence de la mutation $\Delta F508$ et l'activation constitutive de NF- κ B et de AP-1, nous avons étudié le pouvoir transactivateur de ces deux facteurs de transcription dans des cellules HeLa transfectées stablement ou transitoirement avec le vecteur codant pour la protéine CFTR sauvage ou $\Delta F508$. Ces expériences nous ont permis de démontrer que, par sa seule présence, la mutation $\Delta F508$ est capable d'activer les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1.

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'activation de ces deux facteurs de transcription. Les cellules mucoviscidosiques présentent une activité accrue du complexe IKK associée à augmentation de la phosphorylation de l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B- α par rapport aux cellules contrôles. La phosphorylation accrue de I κ B α entraîne sa dégradation par le protéasome comme le suggère la courte demi-vie de I κ B- α observée dans les cellules mucoviscidosiques en comparaison avec les cellules contrôles. De même pour AP-1, nous avons étudié le niveau de phosphorylation des trois MAPK (ERK, JNK et p38) connues pour activer AP-1 ; seule la kinase ERK est phosphorylée constitutivement de manière plus importante dans les cellules mucoviscidosiques par rapport aux cellules contrôles. Ces résultats suggèrent que les kinases IKK et ERK jouent un rôle dans l'activation constitutive des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1.

L'IL-8 est la principale chimiokine évoquée dans le cadre de la mucoviscidose. En effet, la caractéristique majeure de cette pathologie est un influx de neutrophiles dans les tissus pulmonaires, causé par la présence d'IL-8. Or, dans les poumons du fœtus $\Delta F508$, nous avons mis en évidence une expression accrue d'autres molécules inflammatoires dont Groy, ICAM-1, COX-2 et MMP-1. Afin de déterminer quels sont les gènes pro-inflammatoires exprimés par les cellules épithéliales mucoviscidosiques, nous avons réalisé une expérience de microarray pour comparer l'expression génique des cellules CFT-2 et NT-1. De nombreux gènes impliqués dans l'inflammation ont vu leur expression modulée en faveur d'un

processus pro-inflammatoire dans les cellules CFT-2 par rapport aux cellules contrôles (gènes codant pour des cytokines, des molécules d'adhésion, des métalloprotéases, des facteurs de croissance,...). Des expériences de RT-PCR étudiant l'expression de gènes pro-inflammatoires spécifiques ont montré la même tendance dans les cellules HeLa transfectées stablement avec le vecteur codant pour la protéine CFTR $\Delta F508$ ainsi que dans une lignée de cellules épithéliales bronchiques (16HBE-CF) n'exprimant pas de protéine CFTR (knock-down par utilisation d'un antisense CFTR). Ces résultats suggèrent que l'absence de protéine CFTR fonctionnelle est responsable de l'activation de la transcription de nombreux gènes pro-inflammatoires.

La plupart de ces gènes pro-inflammatoires sont connus comme possédant des sites de liaison NF- κ B et AP-1 dans leur promoteur. Afin de déterminer le rôle de ces deux facteurs de transcription dans la régulation de l'expression des gènes pro-inflammatoires mis en évidence dans les cellules mucoviscidosiques, nous avons utilisé un inhibiteur des IKKs, le BAY 11-7085, et un inhibiteur de ERK, le U0126. L'inhibition de l'activité de ces deux kinases, nous a permis d'identifier les gènes pro-inflammatoires sous la dépendance d'une ou des deux voies de signalisation. Les principaux gènes affectés par ces inhibiteurs sont les chimiokines Gro- α , β et l'IL-8, ainsi que les cytokines IL-1 β et l'IL-6. L'utilisation de ces deux inhibiteurs simultanément, nous confirme que ces cytokines pro-inflammatoires sont essentiellement sous le contrôle de ces deux facteurs de transcription (résultats non montrés). Par contre, l'inhibition des molécules inflammatoires telles que la COX2, ICAM-1 et la MMP-1 n'est que partielle avec l'un ou l'autre inhibiteur et l'utilisation combinée de ces deux inhibiteurs n'abolit pas l'expression de ces trois gènes. Ces données suggèrent que, pour certains gènes pro-inflammatoires comme les cytokines et les chimiokines, NF- κ B et AP-1 sont les facteurs de transcription principalement impliqués dans leur sur-expression, alors que pour les autres gènes pro-inflammatoires tels que COX-2, MMP-1 et ICAM-1, il semble que d'autres facteurs de transcription soient également impliqués.

Parmi les gènes pro-inflammatoires sur-exprimés dans les cellules mucoviscidosiques, nous retrouvons ceux codant pour l'IL-1 β et le bFGF. Ces facteurs sont connus pour activer la voie IKK et/ou la voie ERK. Afin de déterminer si l'IL-1 β et le bFGF sécrétés par les cellules mucoviscidosiques sont capables de réguler l'expression des gènes pro-inflammatoires, nous avons utilisé des anticorps neutralisants dirigés contre l'IL-1R et contre le bFGF. L'expression des cytokines Gro- α , Grp- β , IL-1 β , IL-6 et IL-8 est significativement réduite après inhibition de la voie IL-1 β ou bFGF. Sur base de ces observations, nous pouvons

suggérer une boucle d'amplification positive de l'inflammation via l'expression de l'IL-1 β et bFGF

2.3. Conclusion

Ces différents résultats, en accord avec les données obtenues sur les poumons du fœtus Δ F508, nous indiquent que les cellules épithéliales, dépourvues de protéine CFTR fonctionnelle, sont capables d'induire une sur-expression de gènes pro-inflammatoires tels que des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissances, des molécules d'adhésion et des enzymes via entre autres l'activation constitutive des voies IKK et ERK menant à une activation constitutive de NF- κ B et de AP-1 dans les cellules épithéliales respiratoires. Cette activation est maintenue et amplifiée par la sécrétion constitutive de l'IL-1 β et du bFGF.

3. Article N°3:

Verhaeghe C, Tabruyn SP, Oury C, Bours V, Griffioen AW. **Intrinsic pro-angiogenic status of cystic fibrosis airway epithelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun*, 356 (2007); 745-749.

3.1. Contexte

Nous avons montré dans l'étude précédente que le dysfonctionnement de la protéine CFTR pouvait augmenter l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires. Lors de notre analyse par microarray, nous avons également observé la sur-expression de gènes codant pour de nombreux facteurs pro-angiogéniques. L'angiogenèse est un processus physiologique hautement régulé qui permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants. Ce phénomène d'angiogenèse est indispensable lors du développement embryonnaire mais également chez l'adulte. En effet, lors de processus inflammatoires ou de réparations tissulaires, la néovascularisation s'effectue principalement par angiogenèse (Carmeliet, 2005).

L'angiogenèse est un processus complexe qui peut se résumer en quatre étapes. La première consiste en une vasodilatation contrôlée par le monoxyde d'azote. Celui-ci induit la production de VEGF et de l'angiopoïétine-2 conduisant à une augmentation de la perméabilité vasculaire et à une déstabilisation de la paroi vasculaire. La deuxième étape concerne la dégradation de la matrice extracellulaire par des métalloprotéases matricielles (MMP). Ces MMP dégradent la matrice afin de créer un espace pour les cellules endothéliales migrantes mais elles libèrent également une série de facteurs de croissance séquestrés dans cette matrice. Ces facteurs de croissance [VEGF, PLGF (*Placental Like Growth Factor*), EGF, FGF], une fois libérés, induisent la prolifération et la migration des cellules endothéliales. La dernière étape consiste en l'élaboration de contacts intercellulaires destinés à former des tubes ainsi que la maturation des nouveaux vaisseaux via le recouvrement de cellules musculaires lisses et de péricytes (Rundhaug, 2005).

Bien que l'angiogenèse soit fortement contrôlée, de nombreuses pathologies sont associées à un excès d'angiogenèse telles que l'arthrite rhumatoïde, les maladies pulmonaires obstructives chroniques, le psoriasis ou la croissance tumorale (McDonald, 2001; Carmeliet, 2005).

La mucoviscidose touche de nombreux organes ; cependant, les problèmes pulmonaires chroniques ainsi que le remodelage matriciel sont les premières causes de décès chez ces patients. Les infections récurrentes et les réactions inflammatoires concomitantes sont considérées comme étant à la base du problème. Cependant, le remodelage vasculaire est de plus en plus décrit comme jouant un rôle important dans les maladies inflammatoires chroniques (McDonald, 2001; Wilson and Robertson, 2002; Carmeliet, 2005; Keane et al., 2006). En effet, les nouveaux vaisseaux sanguins facilitent la diapédèse de cellules inflammatoires et peuvent libérer des cytokines pro-inflammatoires. Dans le cadre de la mucoviscidose, une quantité élevée de VEGF dans le sang ainsi qu'un excès d'angiogénèse conduisant à des hémorragies pulmonaires ont déjà été observés (McColley et al., 2000; Flume et al., 2005). Le but de cette troisième partie est de caractériser l'effet pro-angiogène intrinsèque des cellules épithéliales mucoviscidosiques.

3.2. Résultats

L'analyse des résultats obtenus par microarray, nous indique qu'un nombre important de facteurs pro-angiogéniques sont sur-exprimés dans les cellules épithéliales mucoviscidosiques (tableau 1) par rapport aux cellules épithéliales contrôles. Ces données nous indiquent que le VEGF n'est pas l'unique facteur pro-angiogène produit par les cellules mucoviscidosiques.

Dans un premier temps, nous avons confirmé par RT-PCR la sur-expression de trois facteurs pro-angiogènes (VEGF-A, VEGF-C et le PLGF) et la répression d'un facteur anti-angiogène (la thrombospondine, THSB) dans les cellules mucoviscidosiques par rapport aux cellules contrôles. La sur-expression du bFGF, de la MMP-1 et de l'IL-8 avait déjà été confirmée dans l'étude précédente. Par ELISA, nous avons confirmé l'expression accrue de VEGF-A dans le surnageant des cellules mucoviscidosiques par rapport aux cellules contrôles.

NOM	Description	Log ratio CFT-2/NT-1
MMP-1	Matrix metallopeptidase 1	12,2
IL-8	Interleukin 8	5,7
MMP-3	Matrix metallopeptidase 3 (Stromelysin 1)	5,3
MMP-2	Matrix metallopeptidase 2 (gelatinase A)	4,9
PLAU	Plasminogen activator, urokinase	2,6
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2 (basic)	2,3
PGF	Placental Growth Factor	1,8
ANGPT1	Angiopoietin 1	1,8
MMP14	Matrix metallopeptidase 14	1,7
PDGFC	Platelet Derived Growth Factor C	1,5
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	1,5
ANGPTL2	Angiopoietin- like 2	1,4
VEGFC	Vascular Endothelial Growth Factor C	1,2
FGF5	Fibroblast Growth Factor 2	1,2
PDGFA	Platelet Derived Growth Factor alpha polypeptide	1,1
THBS1	Thrombospondin 1	-2,4

Tableau 1 : Niveau d'expression des gènes angiogéniques mesuré dans les cellules CFT-2 par rapport à celui mesuré dans les cellules NT-1

L'identification des voies ERK et IKK dans la transcription de molécules pro-inflammatoires, nous a conduit à tester les inhibiteurs BAY 11-7085 et U0126 sur l'expression des ces facteurs angiogènes. Alors que le BAY 11-7085 ne produit aucun effet (résultats non montrés), le U0126 diminue l'expression du VEGF-A et -C ainsi que celle du PLGF à un niveau proche de celui observé dans les cellules contrôles.

Afin de déterminer si la sécrétion accrue de facteurs pro-angiogènes par les cellules mucoviscidosiques est suffisante pour induire l'angiogenèse, nous avons testé l'effet du surnageant provenant des cellules mucoviscidosiques par rapport à celui issu des cellules contrôles sur la propension des cellules endothéliales (HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelium Cells*) à proliférer, migrer et bourgeonner. Le milieu de culture de cellules épithéliales mucoviscidosiques contient suffisamment de molécules pro-angiogènes pour permettre aux cellules endothéliales de proliférer et de migrer plus rapidement que les cellules endothéliales cultivées dans du surnageant de cellules épithéliales contrôles. Les facteurs pro-angiogènes présents dans le surnageant de cellules mucoviscidosiques sont également

capables d'initier le bourgeonnement de cellules endothéliales alors que le surnageant contrôle n'a aucun effet.

3.3. Conclusion

Nos résultats suggèrent que les cellules mucoviscidosiques sont capables, en absence de tout pathogène, d'induire non seulement un processus inflammatoire, mais également l'angiogenèse par la sur-expression de facteurs pro-angiogènes (bFGF, VEGF-A, VEGF-C, PLGF) et par la répression d'au moins un facteur anti-angiogène (THBS). Cet excès d'angiogenèse peut contribuer à l'amplification de l'inflammation et à l'aggravation de la pathologie.

DISCUSSION

La mucoviscidose est la maladie héréditaire grave la plus répandue en Europe. En Belgique, un enfant atteint de mucoviscidose naît chaque semaine et celui-ci peut espérer vivre jusqu'à l'âge de 40 ans si les mutations identifiées sont dites sévères (mutations de classes I à III). Une espérance de vie de 40 ans peut paraître courte ; cependant, cela correspond à un progrès récent et conséquent, lié à une amélioration de la prise en charge thérapeutique. Malgré ces progrès, cette maladie reste toujours incurable. Ces enfants et adolescents atteints de mucoviscidose consacrent en moyenne trois heures par jour à leurs soins. A chaque repas, des enzymes pancréatiques sont prises afin de digérer au mieux les aliments. Un régime alimentaire saturé en graisses, en protéines et en vitamines est également nécessaire pour prévenir le retard de croissance saturo-pondéral. Pour ce qui est des poumons, l'utilisation de broncho-dilatateurs, de mucolytiques et de DNase recombinante permettent une respiration plus aisée mais ceux-ci ne remplacent en rien les séances quotidiennes chez le kinésithérapeute. Pour lutter contre les infections périodiques, des cures d'antibiotiques accompagnées d'anti-inflammatoires sont également nécessaires. Une meilleure connaissance de la physiopathologie de la mucoviscidose permettrait d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'apporter aux patients les soins les mieux appropriés à leurs besoins.

1. L'inflammation... Avant ou après infections

L'inflammation est un élément aggravant de la pathologie pulmonaire liée à la mucoviscidose. Celle-ci est exacerbée par les infections qui sont fréquentes et de longue durée chez les patients mucoviscidosiques du fait de leur appareil mucociliaire perturbé. Par contre, une zone d'ombre subsiste quant à l'origine de cette réaction inflammatoire. En effet, l'hypothèse d'une inflammation intrinsèque de l'épithélium respiratoire et indépendante d'une colonisation bactérienne a été émise mais n'est pas admise par tous.

Au cours de notre thèse de doctorat, nous avons mis en évidence un état inflammatoire intrinsèque dans les poumons d'un fœtus de 24 semaines, homozygote pour la mutation $\Delta F508$, ainsi que dans une lignée cellulaire fœtale également homozygote $\Delta F508$. Ces deux modèles fœtaux représentent du matériel biologique n'ayant jamais été en contact avec des pathogènes. Dans ces conditions, une expression accrue de marqueurs pro-inflammatoires peut être directement reliée à l'absence de CFTR fonctionnelle. Afin d'éliminer toute implication d'un effet clonal lié à l'utilisation d'une seule lignée cellulaire, nous avons également utilisé deux autres lignées cellulaires : les cellules HeLa stablement transfectées avec un vecteur codant pour la protéine CFTR (HeLa-CFTR) ou CFTR- $\Delta F508$ (HeLa CFTR-

$\Delta F508$) ainsi que les lignées épithéliales bronchiques 16HBE14o⁻ et 16HBE14o⁻ Cfr^{-/-}. Ces deux derniers modèles présentent l'avantage d'être des modèles isogéniques contrairement aux cellules NT-1 et CFT-2 qui sont issues de deux patients différents. Au cours de notre étude, nous avons montré, premièrement, que les cellules mucoviscidiques présentaient une expression accrue de marqueurs pro-inflammatoires (interleukines, chimiokines, molécules d'adhésion, facteurs de croissance). Deuxièmement, que les cellules mucoviscidiques présentaient une activation constitutive des facteurs de transcription pro-inflammatoires NF- κ B et AP-1. De plus, nous avons démontré l'implication des kinases IKK et ERK dans la régulation de ces molécules pro-inflammatoires.

Plusieurs études, menées sur des lignées cellulaires diverses, ont montré une élévation de la sécrétion d'IL-8 associée à une activation constitutive de NF- κ B (DiDonato et al., 1997; Tabary et al., 1998; Venkatakrishnan et al., 2000; Knorre et al., 2002). Une production plus importante d'IL-8 a également été observée dans des cultures primaires des cellules épithéliales de patients. Cependant, cette expression accrue s'estompe après un nombre restreint de passages suggérant que ce résultat est une conséquence de la présence de pathogènes chez les patients mucoviscidiques et non d'une inflammation intrinsèque (Aldallal et al., 2002; Becker et al., 2004; Zabner et al., 2005; Wiszniewski et al., 2006). L'absence d'une sécrétion plus importante d'IL-8 à long terme dans les cellules primaires peut s'expliquer par la variabilité individuelle, par les traitements administrés avant le prélèvement ainsi que par l'âge des patients. De plus, Joseph et ses collaborateurs mettent en évidence une activation constitutive de NF- κ B dans des cellules primaires de patients sans modification du niveau d'ARNm de l'IL-8 (Joseph et al., 2005). Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence une expression accrue d'une série de chimiokines montrant que l'IL-8 n'est pas la seule chimiokine produite par les cellules épithéliales. Nos trois lignées cellulaires présentent une induction de l'expression de Gro- α ou de Gro- γ plus importante que celle observée pour l'IL-8 indiquant qu'il serait intéressant de mesurer la production d'autres cytokines pro-inflammatoires par les cellules primaires avant de conclure définitivement à une absence de processus inflammatoire intrinsèque. Cette hypothèse est renforcée par notre étude montrant la présence d'une sur-expression de Gro- γ dans les poumons du fœtus $\Delta F508$ et par l'étude de Hubeau et al. dans laquelle ils n'observent aucune différence au niveau de l'expression de l'IL-8 mais bien une augmentation du nombre de macrophages et de mastocytes durant le dernier stade du développement fœtal (Hubeau et al., 2001).

Nous avons également mis en évidence l'implication des kinases IKK et ERK dans la sur-expression des molécules pro-inflammatoires en l'absence de toute stimulation. En effet, l'inhibition de ces deux kinases permet de réduire significativement l'expression de plusieurs cytokines telles que Gro- α , Gro- β , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8. Le rôle des kinases IKKs et ERK dans la mucoviscidose a déjà été proposé après stimulation aux LPS ou à l'IL-1 β (Li et al., 2003; Tabary et al., 2003; Lora et al., 2005; Saadane et al., 2006; Muselet-Charlier et al., 2007). Cependant leur rôle dans l'inflammation intrinsèque n'avait pas encore été étudié.

Au cours de ce travail, nous avons donc mis en évidence l'existence d'une inflammation intrinsèque causée par l'absence d'un canal CFTR fonctionnel dans les cellules épithéliales respiratoires. Ce dysfonctionnement conduit à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 via les kinases IKK et ERK. De plus, nous décrivons, pour la première fois, un impact de la mutation Δ F508 sur les poumons dès la période fœtale. Jusqu'à présent, seul le pancréas et les intestins de fœtus mucoviscidosiques avaient été décrit comme présentant des perturbations (Thomaidis and Arey, 1963; Szeifert et al., 1985; Ornoy et al., 1987).

En complément aux cultures primaires ou aux lignées cellulaires, des modèles murins ont été générés. Trois ans après le clonage du gène *Cftr*, les premières souris transgéniques sont apparues, à commencer par les souris knock-out suivies des souris homozygotes Δ F508 ou G551D. Ces différents modèles de souris ont fourni de nombreuses informations sur la pathophysiologie de la maladie en particulier au niveau gastro-intestinal. Cependant, les altérations pulmonaires dévastatrices observées chez les patients mucoviscidosiques sont largement absentes dans ces différents modèles murins (Grubb and Boucher, 1999). L'absence de glandes sous-mucosales chez la souris au niveau des bronches et de la trachée peut être une explication à cette absence de phénotype pulmonaire. La présence de canaux chlore compensatoires tels que les CaCC (canaux chlore calcium-dépendent) a également été proposée pour expliquer ce phénomène (Oppenheimer and Esterly, 1975). A l'heure actuelle, la souche de souris C57BL/6J *Cftr*^{-/-} est la seule qui développe un phénotype pulmonaire similaire à celui des patients. En effet, dès l'âge d'un mois, ces souris présentent une dilatation des acini, une obstruction des bronches, un dépôt de collagène et une infiltration de cellules inflammatoires. Il semblerait que le développement de ce phénotype pulmonaire soit lié à l'absence d'activation des canaux CaCC et donc à l'origine génétique de la souche de souris utilisée. En effet, les souris C57BL/6J *Cftr*^{-/-} ne présentent aucune différence de potentiel nasal après stimulation à l'UTP contrairement aux souris non-consanguines *Cftr*^{-/-}.

qui ne présentent pas de phénotype pulmonaire évident. Or, l'UTP induit une augmentation de calcium intracellulaire via l'activation des récepteurs purinergiques P_2Y_2 . Cette augmentation de calcium transitoire active les canaux CaCC compensant ainsi l'absence de CFTR. L'absence de réponse après une stimulation à l'UTP indique que ces souris C57BL/6J *Cftr*^{-/-} ne possèdent pas de canaux chlore compensatoires ou sont incapables de les activer via P_2Y_2 contrairement aux souris non-consanguines. Cette souche de souris C57BL/6J *Cftr*^{-/-} est donc un outil précieux pour mieux comprendre la pathophysiologie de la mucoviscidose. La limitation principale de ce modèle réside dans la sévérité des problèmes intestinaux causant la perte des animaux en l'absence d'un régime alimentaire strict (Kent et al., 1997; Durie et al., 2004).

2. Rôle du stress du réticulum endoplasmique dans la réponse inflammatoire

La mutation du gène *Cftr* la plus fréquemment rencontrée dans la population caucasienne est la mutation $\Delta F508$. Cette mutation conduit à la production de protéines restant séquestrées dans le réticulum endoplasmique suite à un mauvais repliement. Ces protéines mutées sont ensuite reconnues par une série de protéines chaperones qui les acheminent vers le protéasome où elles sont dégradées. Sur base de ces données, le stress du réticulum endoplasmique a été une des premières hypothèses proposées pour expliquer une inflammation intrinsèque (Knorre et al., 2002). En effet, Léonardi et ses collaborateurs ont montré que la rétention de la thyroglobuline dans le réticulum endoplasmique induit l'activation de NF- κ B ainsi que celle de la JNK (Leonardi et al., 2002).

Cependant, dans le cadre de la mucoviscidose, certains éléments sont en désaccord avec l'hypothèse d'un stress du réticulum endoplasmique. Premièrement, les mutations de classe II ne sont pas les seules à induire un phénotype sévère. En effet, comme le montre le phénotype des patients mucoviscidosiques, l'absence de CFTR (mutation non-sens) et la mutation G551D (mutation de classe III) génèrent également des cycles d'infection/inflammation chroniques. Deuxièmement, la protéine CFTR est exprimée à un taux relativement bas et seulement 25 % des protéines synthétisées atteignent la membrane plasmique. Ce qui signifie qu'une cellule saine dégrade 75% de la quantité de CFTR produite en comparaison à une cellule $\Delta F508/\Delta F508$ qui dégrade la totalité de sa production. La différence est minime, surtout si ces données sont comparées avec les cellules d'une personne

hétérozygote (WT/ Δ F508) qui dégradent plus de 85% de la quantité totale de protéines CFTR sans toutefois développer un phénotype inflammatoire (Kopito, 1999; Machen, 2006). Finalement, à ces données s'ajoute une étude récente réalisée sur des cultures primaires de cellules respiratoires de patients qui ne montre aucune différence au niveau de l'activation de facteurs impliqués spécifiquement dans la transmission d'un stress du réticulum endoplasmique tels que les kinases PERK (*protein kinase R (PKR)-like ER kinase*), IRE-1 α (*endoribonuclease inositol requiring-1 α*) et le facteur de transcription ATF-6 (*activating transcription factor 6*). Ces résultats indiquent qu'un stress du réticulum endoplasmique généré par l'accumulation de protéines mal-repliées (UPR, *unfolded protein response*) est peu probable pour expliquer le phénotype inflammatoire des cellules homozygotes Δ F508 (Nanua et al., 2006).

3. CFTR et la réaction inflammatoire

Au cours de ce travail, nous avons montré que les cellules mucoviscidiques produisaient de nombreux facteurs pro-inflammatoires. Nous avons mis en évidence un rôle important des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 dans la régulation de gènes codant pour des marqueurs pro-inflammatoires. Cependant, le lien entre le dysfonctionnement du canal CFTR et l'activation de ces facteurs de transcription reste à déterminer. Plusieurs hypothèses pourraient être formulées : se pourrait-il, par exemple, que dans une cellule saine, CFTR contrôle la réponse inflammatoire en inhibant ces facteurs de transcription ou bien est-ce la protéine mutée qui activerait les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 ?

3.1. CFTR comme régulateur négatif de la réaction inflammatoire

Une étude, menée sur des rats, met en évidence un rôle essentiel de CFTR durant le développement pulmonaire. Dans cette étude, Cohen et son équipe ont inhibé transitoirement l'expression de CFTR dans des tissus pulmonaires fœtaux. Trois mois après le traitement *in utero*, un épaississement et une fibrose des parois pulmonaires ainsi qu'une infiltration de cellules inflammatoires dans le parenchyme sont observés. L'équipe de Cohen propose que le dysfonctionnement de CFTR ou de toute autre protéine jouant un rôle dans cette cascade, mène à une différenciation incomplète des cellules sécrétrices et à la perte de leurs fonctions. Une de leurs fonctions est l'inhibition de l'expression de cytokines produites par les cellules épithéliales non-sécrétrices qui, une fois le système immunitaire mis en place, jouent un rôle

pro-inflammatoire menant à l'inflammation chronique et à la fibrose pulmonaire (Cohen and Larson, 2005).

Une deuxième hypothèse en faveur de CFTR comme régulateur négatif est basée sur une étude utilisant un inhibiteur spécifique de CFTR, le CFTR_{inh}-172. Dans cette étude, l'utilisation de l'inhibiteur CFTR_{inh}-172 sur des cellules primaires épithéliales bronchiques non-mucoviscidosiques induit un phénotype inflammatoire proche de celui observé chez les patients mucoviscidosiques. En effet, Perez et ses collaborateurs mesurent une sécrétion d'IL-8, d'IL-6 ou de GM-CSF plus importante ainsi qu'une translocation nucléaire de NF- κ B supérieure à l'état basal et/ou en réponse au TNF- α ou à des bactéries, après traitement avec l'inhibiteur CFTR_{inh}-172. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de CFTR est suffisante pour augmenter la sécrétion constitutive de cytokines pro-inflammatoires et pour induire une réponse inflammatoire exacerbée en présence de bactéries ou de TNF- α (Perez et al., 2007).

Une troisième étude, réalisée sur le canal sodique ENaC, nous permet de proposer une hypothèse allant dans le même sens. Lebowitz et ses collaborateurs ont identifié une interaction entre la sous-unité IKK β et le canal ENaC. Cette interaction permet au canal ENaC d'augmenter son activité via l'induction de son expression membranaire mais aussi d'activer le facteur de transcription NF- κ B (Lebowitz et al., 2004). Or, CFTR est connue pour interagir avec de nombreuses protéines dont le canal ENaC. L'activité de ce canal ENaC est régulée négativement par CFTR. Lorsque la protéine CFTR est absente de la membrane ou mutée dans son site NBD1, l'interaction CFTR/ENaC n'a plus lieu levant ainsi l'inhibition de CFTR sur le canal ENaC. Nous pouvons donc envisager que, dans les cellules saines, l'inhibition qu'exerce la protéine CFTR sur le canal ENaC, empêcherait l'activation de NF- κ B alors que dans les cellules CFTR- Δ F508, l'absence d'inhibition par CFTR active le canal ENaC et par la même occasion NF- κ B. Nos expériences préliminaires semblent indiquer que la protéine CFTR sauvage diminue le pouvoir transcriptionnel de NF- κ B mais également de AP-1 (Figure P1) suggérant que CFTR peut avoir un rôle de régulateur négatif de la réponse inflammatoire.

3.2. CFTR- Δ F508 comme activateur de la réaction inflammatoire

Par la technique du double hybride en levure nous avons identifié la protéine SODD/BAG4 (*Silencer Of Death Domain/Bcl2 associated athanogene [BAG] 4*) comme interagissant avec la partie C-terminale de CFTR (Figure P2). Cette protéine chaperone est connue pour interagir avec le récepteur au TNF en l'absence de ligand afin d'empêcher toute

activation constitutive de la voie du TNF. Une fois le TNF lié à son récepteur, SODD se détache du récepteur pour laisser la place aux protéines TRADD (*TNF-receptor-associated death domain protein*), TRAF2 (*TNF-receptor-associated factor 2*) et RIP (*receptor-interacting protein*) nécessaire à l'activation de NF- κ B (Jiang et al., 1999). Afin de déterminer si cette interaction est restreinte à SODD/BAG4, nous avons étudié l'interaction de CFTR avec deux autres membres de la famille BAG, BAG-1 et BAG-3. Sur base de nos résultats préliminaires, il semblerait que CFTR puisse interagir avec BAG-3 alors que CFTR- Δ F508 est capable d'interagir à la fois avec BAG-1 et BAG-3 (Figure P3). Ces résultats indiquent que le domaine BAG est requis pour cette interaction avec CFTR/CFTR- Δ F508.

Par ailleurs, une étude récente vient de dévoiler l'identité d'une centaine de protéines interagissant avec CFTR sous sa forme sauvage et/ou mutée (Wang et al., 2006). Parmi ces protéines, on retrouve Hsp90, Hsp70, le Cdc37 mais également BAG1, BAG-2 et BAG-3 qui se lie préférentiellement à CFTR- Δ F508. Or, les membres de la famille BAG sont connus pour interagir avec les protéines chaperones Hsp90 et Hsp70 (Ballinger et al., 1999; Alberti et al., 2002; Doong et al., 2002). L'interaction de CFTR- Δ F508 avec SODD/Hsp90/Cdc37 suggère un lien éventuel entre la protéine CFTR- Δ F508 et l'activation de NF- κ B puisque les deux molécules chaperones Hsp90 et Cdc37 interagissent d'une part avec les IKKs et d'autre part avec CFTR- Δ F508 (Chen et al., 2002; Broemer et al., 2004; Pittet et al., 2005; Park et al., 2007).

Une deuxième hypothèse en faveur d'une activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 par la protéine CFTR- Δ F508, est une augmentation du calcium mobilisable dans les cellules mucoviscidosiques. En effet, la régulation de l'activation de NF- κ B ou de ERK par le calcium a été étudiée dans plusieurs types cellulaires (Petrovic et al., 2006; Copland and Post, 2007; Garcia et al., 2007; Sohn et al., 2007; Valdes et al., 2007). De plus, de nombreux stimuli tels que les cytokines ou les LPS sont connus pour induire une augmentation transitoire et rapide du calcium intracellulaire. L'équipe de R. C. Boucher a démontré récemment que les cellules épithéliales bronchiques de patients mucoviscidosiques présentaient un niveau de calcium mobilisable plus important que les cellules épithéliales bronchiques contrôles. Cependant, d'après ces auteurs, cette augmentation provient d'une expansion du réticulum endoplasmique qui serait causée par les infections et inflammations chroniques des voies respiratoires et non par la rétention de la protéine CFTR- Δ F508 (Ribeiro et al., 2005a; Ribeiro et al., 2005b). Plus récemment, Tabary et ses collaborateurs ont démontré que l'IL-1 β induisait une libération prolongée de calcium intracellulaire dans les

cellules IB3 ($\Delta F508/W1284X$) en comparaison avec les cellules S9 (cellules IB3 corrigée avec le CFTR sauvage). Cette mobilisation de calcium est impliquée dans l'activation de NF- κ B puisque le traitement des cellules IB3 avec un chélateur de calcium, le BAPTA-AM, inhibe l'activation de NF- κ B induite par l'IL-1 β (Tabary et al., 2005). Suite à ces études, nous nous sommes intéressés à l'importance du calcium dans notre modèle cellulaire. Après traitement à la thapsigargine (agent permettant la libération du calcium provenant du réticulum endoplasmique), les cellules CFT-2 présentent une libération de calcium intracellulaire plus importante que les cellules contrôles. Ces résultats, bien que préliminaires, semblent en accord avec les études ci-dessus indiquant que les cellules mucoviscidosiques possèdent une réserve de calcium plus importante que les cellules contrôles. Cette réserve de calcium pourrait être impliquée dans l'activation constitutive de NF- κ B et AP-1 et/ou dans le maintien de cette activation.

Une troisième hypothèse, basée sur nos résultats préliminaires, suggère l'implication des céramides dans l'activation constitutive de NF- κ B et de AP-1. En effet, par spectrométrie de masse, nous avons montré pour la première fois que le taux de céramides à longues chaînes est plus élevé dans les cellules mucoviscidosiques (CFT-2 et HeLa CFTR- $\Delta F508$) que dans les cellules contrôles (NT-1 et HeLa CFTR-WT) (Figure P4). Or, un certain nombre d'études mettent en évidence le rôle des céramides en tant que seconds messagers dans l'activation de NF- κ B et de AP-1 (Zumbansen and Stoffel, 1997; Majumdar et al., 2002; Sreenivasan et al., 2003; Uehara et al., 2003; Ogretmen and Hannun, 2004). Les céramides sont principalement impliqués dans diverses voies de signalisation liées à des processus de différenciation, de croissance cellulaire, de sénescence et d'apoptose (Hannun, 1996; Ogretmen and Hannun, 2004; Seumois et al., 2007). Cependant, dans les cellules épithéliales intestinales, un rôle pro-inflammatoire leur est connu, notamment via la synthèse de la COX-2 (Homaidan et al., 2003). Une augmentation de céramides peut être induite par des cytokines telles que le TNF- α , l'INF- γ ou l'IL-1 β ainsi que par des stress comme les UV, les oxydants, les radiations ionisantes (Hannun, 1996; Ogretmen and Hannun, 2004). Une synthèse de céramides causée par le dysfonctionnement de CFTR est également envisageable. En effet, comme CFTR est impliquée dans le maintien de l'équilibre rédox du liquide à la surface des cellules épithéliales, des mutations dans cette protéine peuvent perturber cet équilibre. Les cellules déficientes en CFTR secrètent moins de glutathion affectant ainsi les défenses anti-oxydantes et causant un stress oxydant dans les voies respiratoires des patients mucoviscidosiques (Gao et al., 1999; Hudson, 2004). Ainsi, un stress oxydant, causé par le dysfonctionnement de

CFTR, pourrait conduire à l'activation de NF- κ B (Schoonbroodt et al., 2000; Volanti et al., 2002; Kabe et al., 2005) et de AP-1 (Kim et al., 2005; Matos et al., 2005) via la synthèse de céramides.

4. Rôle de l'angiogenèse dans la mucoviscidose

A côté des différents processus capables d'initier une réaction inflammatoire, l'angiogenèse participe activement au maintien et à l'amplification de la réponse inflammatoire. En effet, la perméabilité des nouveaux vaisseaux sanguins formés ainsi que la présence accrue de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales de ces vaisseaux, facilitent le transport et l'infiltration des cellules inflammatoires. A leur tour, ces cellules inflammatoires produisent des facteurs de croissance et des chimiokines contribuant au maintien du processus angiogène. L'angiogenèse contribue ainsi à la transition d'une inflammation aiguë en une inflammation chronique (Bonnet and Walsh, 2005; Lai and Adams, 2005). L'angiogenèse pathologique est présente dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques telles que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies pulmonaires obstructives chroniques et l'hypertension pulmonaire. Elle résulte d'un déséquilibre entre les facteurs pro-angiogènes et les facteurs anti-angiogènes (Wilson and Robertson, 2002; Papaioannou et al., 2006). Le VEGF et le bFGF sont deux activateurs centraux de l'angiogenèse et favorisent la perméabilité vasculaire. Ces deux facteurs induisent la migration et le bourgeonnement des cellules endothéliales dans la matrice extra-cellulaire en induisant l'expression de metalloprotéases et de l'activateur du plasminogène par les cellules endothéliales. Dans le cadre de l'angiogenèse associée à l'inflammation, l'expression de ces deux facteurs de croissance est régulée principalement par les lymphocytes et les neutrophiles via la sécrétion de cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6 (Wilson and Robertson, 2002; Papaioannou et al., 2006; Malemud, 2007).

Un niveau élevé de VEGF a été retrouvé dans les lavages broncho-alvéolaires et dans les biopsies bronchiques de patients asthmatiques ou souffrant de maladies pulmonaires obstructives chroniques. De plus, il existe une corrélation négative entre le niveau d'expression de VEGF et la fonction respiratoire des patients suggérant un rôle du VEGF dans le remodelage pulmonaire (Kanazawa et al., 2002; Chetta et al., 2005; Feltis et al., 2006; Hoshino, 2006; Papaioannou et al., 2006). La présence d'un processus angiogénique dans la mucoviscidose est moins claire. En effet, seul un excès de VEGF dans le sang ainsi qu'un excès d'angiogenèse dans les polypes nasaux ont été observés chez les patients

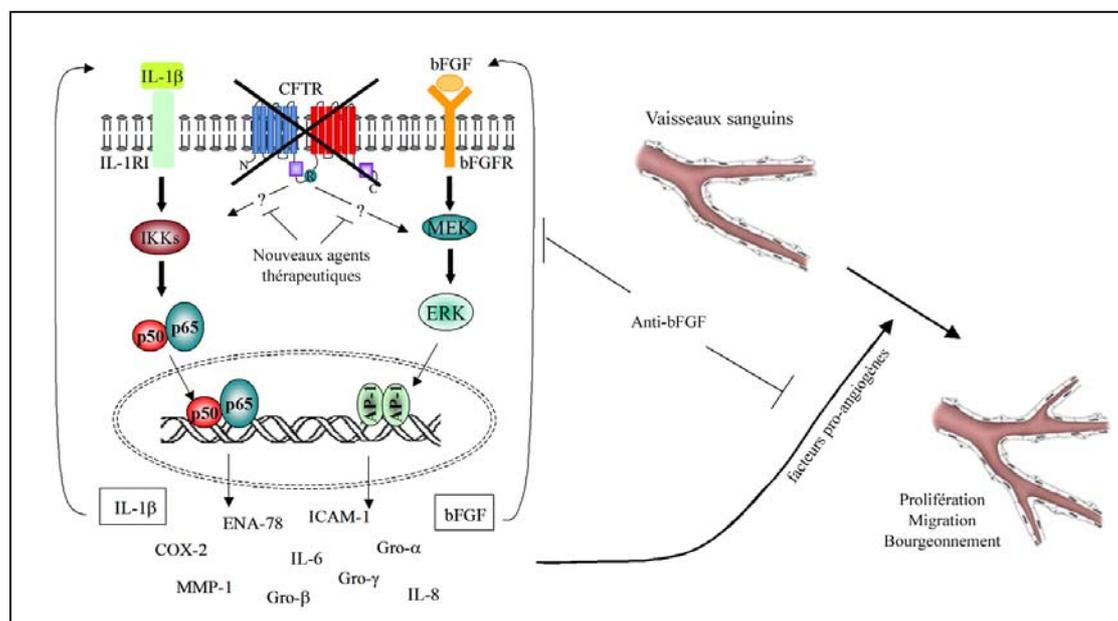
mucoviscidosiques (McColley et al., 2000; Flume et al., 2005). Au cours de notre travail, nous avons montré qu'un processus angiogénique dépendant des cellules épithéliales pourrait exister chez les patients mucoviscidosiques. Ce processus serait induit par les cellules épithéliales et non par les cellules inflammatoires comme généralement décrit. En effet, nous avons mis en évidence la production, par les cellules épithéliales mucoviscidosiques, de nombreux facteurs pro-angiogènes comme le VEGF ou le bFGF ainsi que des chimiokines telles que Gro- α , Gro- β , Gro- γ , ENA-78 et l'IL-8 connues pour induire l'angiogenèse (Le et al., 2004; Douglas and Nicolls, 2005; Lai and Adams, 2005).

Les thérapies anti-angiogènes actuelles sont principalement basées sur l'inhibition de la voie de signalisation VEGF/VEGFR (Kiselyov et al., 2007; Malemud, 2007). Au cours d'expériences préliminaires, nous montrons que l'utilisation d'un anticorps anti-VEGF ou anti-bFGF seul n'a que peu d'effet sur la prolifération des cellules endothéliales cultivées en présence de surnageant de cellules mucoviscidosiques. La combinaison des deux anticorps permet d'inhiber de manière importante et significative cette prolifération (Figure P5). D'un point de vue thérapeutique, l'inhibition du VEGF seul ne suffirait pas à contrer l'excès d'angiogenèse induite par les cellules épithéliales mucoviscidosiques. D'autre part, ces résultats mettent en évidence un rôle du bFGF dans la prolifération des cellules endothéliales. Or, dans le cadre de notre deuxième étude, nous avons également montré la participation du bFGF dans le processus d'amplification de la réaction inflammatoire. Au vu de ces différents éléments, il serait tentant d'envisager une thérapie anti-bFGF afin de réduire le processus angiogène et d'inhiber une des voies conduisant à la sur-expression de molécules pro-inflammatoires.

5. NF- κ B et AP-1 comme cible thérapeutique ?

Sur base des résultats obtenus au cours de ce travail, nous pourrions imaginer le développement de nouveaux agents anti-inflammatoires dirigés contre NF- κ B et AP-1 et utiles pour la prévention ou le traitement de l'inflammation liée à la mucoviscidose. Cependant, l'utilisation chronique de tels agents pourrait générer des effets néfastes. De plus, nous avons mis en évidence un certain nombre de protéines pro-inflammatoires comme COX-2, ICAM-1 et la MMP-1 dont l'expression n'est que partiellement affectée par l'inhibition simultanée de NF- κ B et de AP-1 dans nos modèles (Figure P6). Ces données suggèrent que d'autres facteurs de transcription, également connus pour induire l'expression de marqueurs pro-inflammatoires, puissent être activés dans la mucoviscidose. Parmi ceux-ci, on trouve les

facteurs de transcription NF-AT (*Nuclear Factor of Activated T cell*), NF-IL-6 (*Nuclear Factor of IL-6* ou *CCAAT/enhancer binding protein beta*), CREB (*CCAAT/Enhancer Binding Protein*), C/EBP (*cyclic AMP Response Element Binding Protein*), STAT6 (*signal-transducer-and-activator-of-transcription-factor-6*), PPAR (*Peroxisome Proliferator-activated Receptor*) ou encore Nrf2 (*bZIP transcription factor*). Tous ces facteurs ont été impliqués dans des maladies inflammatoires et peuvent induire l'expression de molécules inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-8, la COX-2 ou encore les MMPs (Raymond et al., 2006; Roth and Black, 2006; Thimmulappa et al., 2006; Zhang, 2006; Edwards et al., 2007; Hu et al., 2007; Kawaguchi et al., 2007; Thomas et al., 2007). Enfin, l'identification du mécanisme reliant CFTR à l'activation de NF- κ B et AP-1 ainsi qu'à l'activation éventuelle d'autres facteurs de transcription permettrait de définir de nouvelles cibles thérapeutiques afin de synthétiser des inhibiteurs plus spécifiques agissant en amont de l'activation de ces facteurs de transcription. L'identification de l'implication des IKKs et de la kinase ERK est une première étape dans l'identification des molécules intervenant dans ces cascades de signalisation.



Mécanismes moléculaires de l'inflammation intrinsèque dans les cellules mucoviscidiques.

Voies de signalisation reliant le dysfonctionnement de la protéine CFTR à la production de gènes pro-inflammatoires et pro-angiogènes dépendant de NF- κ B et de AP-1 via l'activation des kinases IKK et ERK. Parmi les marqueurs pro-inflammatoires sur-exprimés, l'IL-1 β et le bFGF amplifient la réponse inflammatoire via l'activation de NF- κ B et de AP-1. Le bFGF ainsi que d'autres facteurs pro-angiogènes produits par les cellules mucoviscidiques induisent la migration, la prolifération et le bourgeonnement des cellules endothéliales. Des agents pharmacologiques agissant en amont des facteurs de transcription et/ou sur

l'angiogenèse permettraient d'atténuer la réponse inflammatoire intrinsèque induite par les cellules épithéliales mucoviscidosiques.

6. Perspectives

Dans le cadre de notre étude concernant l'interaction entre SODD et CFTR, nous avons réalisé des expériences de mutagenèse dirigée sur la partie carboxy-terminale de CFTR afin d'identifier le(s) domaine(s) d'interaction avec SODD. La région carboxy-terminale de CFTR a été soumise à une analyse bio-informatique par la société Biosiris (*Protein investigator, Gembloux, Belgique*). Cette analyse a permis d'identifier plusieurs domaines d'interaction potentiels avec CFTR. Les différents mutants proposés seront dans un premier temps testés afin de mettre en évidence une perte éventuelle d'interaction avec SODD. Dans un second temps, nous étudierons l'implication de cette perte d'interaction sur la voie de signalisation du TNF- α et notamment sur l'activation de NF- κ B et AP-1 dans les lignées cellulaires CFTR Δ F508. Le pouvoir transactivateur de NF- κ B et AP-1 sera analysé dans ces cellules traitées ou non au TNF- α . Ces différentes expériences nous indiqueront si l'interaction de CFTR avec SODD peut intervenir dans le processus pathophysiologique de la mucoviscidose.

L'hypothèse du calcium sera également approfondie. Après avoir confirmé la quantité accrue de calcium mobilisable dans les cellules mucoviscidosiques, nous étudierons l'effet du calcium sur l'activation de NF- κ B et de AP-1 en utilisant un chélateur de calcium intracellulaire (BAPTA-AM). L'expression des gènes pro-inflammatoires sera étudiée dans ces mêmes conditions afin d'évaluer si le calcium est un élément déterminant dans le processus inflammatoire intrinsèque.

Nous avons mis en évidence une production plus importante de céramides à longue chaîne dans deux lignées de cellules mucoviscidosiques par rapport aux lignées contrôles. Nous souhaitons dans un premier temps déterminer quelle est la voie de synthèse des céramides dans notre modèle. Pour cela nous utiliserons des inhibiteurs connus de chacune des voies de synthèse des céramides (la voie *de novo*, de la sphingomyélinase acide et de la sphingomyélinase neutre) afin de diminuer le taux de céramides dans nos cellules mucoviscidosiques. Après identification de la voie de synthèse, nous inhiberons la production de céramides et nous analyserons l'effet de cette inhibition sur l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 et sur l'expression des gènes pro-inflammatoires.

Au terme de ce travail et au vu de l'ensemble des données disponibles, il apparaît qu'un traitement simple et efficace contre la mucoviscidose n'existe pas. Cependant, la mise en évidence d'un rôle intrinsèque de CFTR dans la réaction inflammatoire est capitale dans la compréhension de la maladie et dans le développement de nouvelles thérapies. L'identification du mécanisme précis reliant le dysfonctionnement de la protéine CFTR à l'activation des facteurs de transcription permettrait de définir les cibles les plus adéquates pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques.

RESULTATS
PRELIMINAIRES

BIBLIOGRAPHIE

- Adcock, I. M., Chung, K. F., Caramori, G., and Ito, K. (2006). Kinase inhibitors and airway inflammation. *Eur J Pharmacol* 533, 118-132.
- Akabas, M. H. (2000). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J Biol Chem* 275, 3729-3732.
- Akata, D., and Akhan, O. (2007). Liver manifestations of cystic fibrosis. *Eur J Radiol* 61, 11-17.
- Alberti, S., Demand, J., Esser, C., Emmerich, N., Schild, H., and Hohfeld, J. (2002). Ubiquitylation of BAG-1 suggests a novel regulatory mechanism during the sorting of chaperone substrates to the proteasome. *J Biol Chem* 277, 45920-45927.
- Aldallal, N., McNaughton, E. E., Manzel, L. J., Richards, A. M., Zabner, J., Ferkol, T. W., and Look, D. C. (2002). Inflammatory response in airway epithelial cells isolated from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 1248-1256.
- Aleksandrov, A. A., Aleksandrov, L. A., and Riordan, J. R. (2007). CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel. *Pflugers Arch* 453, 693-702.
- Andersen, D. H. (1938). Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am J Dis Child* 56, 344-399.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P., and Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49, 729-739.
- Arias, J., Alberts, A. S., Brindle, P., Claret, F. X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J., and Montminy, M. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 370, 226-229.
- Armstrong, D. S., Grimwood, K., Carlin, J. B., Carzino, R., Gutierrez, J. P., Hull, J., Olinsky, A., Phelan, E. M., Robertson, C. F., and Phelan, P. D. (1997). Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 1197-1204.
- Armstrong, D. S., Hook, S. M., Jansen, K. M., Nixon, G. M., Carzino, R., Carlin, J. B., Robertson, C. F., and Grimwood, K. (2005). Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Pediatr Pulmonol* 40, 500-510.
- Ballinger, C. A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L. J., Yin, L. Y., and Patterson, C. (1999). Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* 19, 4535-4545.
- Balough, K., McCubbin, M., Weinberger, M., Smits, W., Ahrens, R., and Fick, R. (1995). The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 20, 63-70.
- Barnes, P. J. (2006). Transcription factors in airway diseases. *Lab Invest* 86, 867-872.

- Barnes, P. J., and Adcock, I. M. (1998). Transcription factors and asthma. *Eur Respir J* 12, 221-234.
- Basseres, D. S., and Baldwin, A. S. (2006). Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25, 6817-6830.
- Bear, C. E., Li, C. H., Kartner, N., Bridges, R. J., Jensen, T. J., Ramjeesingh, M., and Riordan, J. R. (1992). Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* 68, 809-818.
- Becker, M. N., Sauer, M. S., Muhlebach, M. S., Hirsh, A. J., Wu, Q., Verghese, M. W., and Randell, S. H. (2004). Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 645-653.
- Berrou, E., and Bryckaert, M. (2001). Platelet-derived growth factor inhibits smooth muscle cell adhesion to fibronectin by ERK-dependent and ERK-independent pathways. *J Biol Chem* 276, 39303-39309.
- Blattner, C., Kannouche, P., Litfin, M., Bender, K., Rahmsdorf, H. J., Angulo, J. F., and Herrlich, P. (2000). UV-Induced stabilization of c-fos and other short-lived mRNAs. *Mol Cell Biol* 20, 3616-3625.
- Bonnet, C. S., and Walsh, D. A. (2005). Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 44, 7-16.
- Boucher, R. C. (2004). New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 23, 146-158.
- Boucher, R. C. (2007). Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease. *J Intern Med* 261, 5-16.
- Boucher, R. C., Stutts, M. J., Knowles, M. R., Cantley, L., and Gatzky, J. T. (1986). Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest* 78, 1245-1252.
- Bours, V., Franzoso, G., Azarenko, V., Park, S., Kanno, T., Brown, K., and Siebenlist, U. (1993). The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* 72, 729-739.
- Bradbury, N. A., Jilling, T., Berta, G., Sorscher, E. J., Bridges, R. J., and Kirk, K. L. (1992). Regulation of plasma membrane recycling by CFTR. *Science* 256, 530-532.
- Brody, J. S., and Spira, A. (2006). State of the art. Chronic obstructive pulmonary disease, inflammation, and lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 3, 535-537.
- Broemer, M., Krappmann, D., and Scheidereit, C. (2004). Requirement of Hsp90 activity for IkappaB kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF-kappaB activation. *Oncogene* 23, 5378-5386.
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.

- Castellani, C., Picci, L., Scarpa, M., Dehecchi, M. C., Zanolla, L., Assael, B. M., and Zacchello, F. (2005). Cystic fibrosis carriers have higher neonatal immunoreactive trypsinogen values than non-carriers. *Am J Med Genet A* 135, 142-144.
- Chen, G., Cao, P., and Goeddel, D. V. (2002). TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell* 9, 401-410.
- Chetta, A., Zanini, A., Foresi, A., D'Ippolito, R., Tipa, A., Castagnaro, A., Baraldo, S., Neri, M., Saetta, M., and Olivieri, D. (2005). Vascular endothelial growth factor up-regulation and bronchial wall remodelling in asthma. *Clin Exp Allergy* 35, 1437-1442.
- Chinenov, Y., and Kerppola, T. K. (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* 20, 2438-2452.
- Chmiel, J. F., and Davis, P. B. (2003). State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir Res* 4, 8.
- Cigana, C., Nicolis, E., Pasetto, M., Assael, B. M., and Melotti, P. (2006). Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 350, 977-982.
- Cohen, J. C., and Larson, J. E. (2005). Pathophysiologic consequences following inhibition of a CFTR-dependent developmental cascade in the lung. *BMC Dev Biol* 5, 2.
- Coleman, F. T., Mueschenborn, S., Meluleni, G., Ray, C., Carey, V. J., Vargas, S. O., Cannon, C. L., Ausubel, F. M., and Pier, G. B. (2003). Hypersusceptibility of cystic fibrosis mice to chronic *Pseudomonas aeruginosa* oropharyngeal colonization and lung infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1949-1954.
- Comeau, A. M., Parad, R. B., Dorkin, H. L., Dovey, M., Gerstle, R., Haver, K., Lapey, A., O'Sullivan, B. P., Waltz, D. A., Zwerdling, R. G., and Eaton, R. B. (2004). Population-based newborn screening for genetic disorders when multiple mutation DNA testing is incorporated: a cystic fibrosis newborn screening model demonstrating increased sensitivity but more carrier detections. *Pediatrics* 113, 1573-1581.
- Conese, M., Copreni, E., Di Gioia, S., De Rinaldis, P., and Fumarulo, R. (2003). Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros* 2, 129-135.
- Copland, I. B., and Post, M. (2007). Stretch-activated signaling pathways responsible for early response gene expression in fetal lung epithelial cells. *J Cell Physiol* 210, 133-143.
- Corvol, H., Fitting, C., Chadelat, K., Jacquot, J., Tabary, O., Boule, M., Cavaillon, J. M., and Clement, A. (2003). Distinct cytokine production by lung and blood neutrophils from children with cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284, L997-1003.
- Couetil, L. L., Art, T., de Moffarts, B., Becker, M., Melotte, D., Jaspar, F., Bureau, F., and Lekeux, P. (2006). DNA binding activity of transcription factors in bronchial cells of horses with recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol* 113, 11-20.

- Courtney, J. M., Ennis, M., and Elborn, J. S. (2004). Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 3, 223-231.
- Cox, D. G., Crusius, J. B., Peeters, P. H., Bueno-de-Mesquita, H. B., Pena, A. S., and Canzian, F. (2005). Haplotype of prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 is involved in the susceptibility to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 11, 6003-6008.
- Cutting, G. R. (2002). Cystic fibrosis, Vol 2, Fourth Edition edn, Churchill Livingstone).
- Dallegri, F., and Ottonello, L. (1997). Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res* 46, 382-391.
- Davies, J., Alton, E., and Griesenbach, U. (2005). Cystic fibrosis modifier genes. *J R Soc Med* 98 *Suppl* 45, 47-54.
- Davies, J. C. (2006). New tests for cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 7 *Suppl* 1, S141-143.
- Davis, P. B. (2006). Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 475-482.
- Dawson, K. P., and Frossard, P. M. (2000). A hypothesis regarding the origin and spread of the cystic fibrosis mutation deltaF508. *Qjm* 93, 313-315.
- De Boeck, K., Wilschanski, M., Castellani, C., Taylor, C., Cuppens, H., Dodge, J., and Sinaasappel, M. (2006). Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 61, 627-635.
- Deguchi, J. O., Aikawa, M., Tung, C. H., Aikawa, E., Kim, D. E., Ntziachristos, V., Weissleder, R., and Libby, P. (2006). Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo. *Circulation* 114, 55-62.
- Dejardin, E., Droin, N. M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z. W., Karin, M., Ware, C. F., and Green, D. R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17, 525-535.
- Deng, T., and Karin, M. (1994). c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* 371, 171-175.
- Di Sant'Agnese, P. A., Darling, R. C., Perera, G. A., and Shea, E. (1953). Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 12, 549-563.
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M. (1997). A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388, 548-554.
- DiMango, E., Ratner, A. J., Bryan, R., Tabibi, S., and Prince, A. (1998). Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 101, 2598-2605.
- Doong, H., Vrtilas, A., and Kohn, E. C. (2002). What's in the 'BAG'?--A functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Lett* 188, 25-32.

- Douglas, I. S., and Nicolls, M. R. (2005). Chemokine-mediated angiogenesis: an essential link in the evolution of airway fibrosis? *J Clin Invest* 115, 1133-1136.
- Drumm, M. L., Konstan, M. W., Schluchter, M. D., Handler, A., Pace, R., Zou, F., Zariwala, M., Fargo, D., Xu, A., Dunn, J. M., *et al.* (2005). Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 353, 1443-1453.
- Durie, P. R., Kent, G., Phillips, M. J., and Ackerley, C. A. (2004). Characteristic multiorgan pathology of cystic fibrosis in a long-living cystic fibrosis transmembrane regulator knockout murine model. *Am J Pathol* 164, 1481-1493.
- Edwards, M. R., Haas, J., Panettieri, R. A., Jr., Johnson, M., and Johnston, S. L. (2007). Corticosteroids and beta 2 agonists differentially regulate rhinovirus induced IL-6 via distinct cis-acting elements. *J Biol Chem*.
- Eferl, R., and Wagner, E. F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3, 859-868.
- Fan, Z., Bau, B., Yang, H., and Aigner, T. (2004). IL-1beta induction of IL-6 and LIF in normal articular human chondrocytes involves the ERK, p38 and NFkappaB signaling pathways. *Cytokine* 28, 17-24.
- Feltis, B. N., Wignarajah, D., Zheng, L., Ward, C., Reid, D., Harding, R., and Walters, E. H. (2006). Increased vascular endothelial growth factor and receptors: relationship to angiogenesis in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 1201-1207.
- Flume, P. A., Yankaskas, J. R., Ebeling, M., Hulsey, T., and Clark, L. L. (2005). Massive hemoptysis in cystic fibrosis. *Chest* 128, 729-738.
- Fujita, T., Nolan, G. P., Liou, H. C., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev* 7, 1354-1363.
- Funk, C. D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871-1875.
- Gadsby, D. C., Vergani, P., and Csanady, L. (2006). The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440, 477-483.
- Gao, L., Kim, K. J., Yankaskas, J. R., and Forman, H. J. (1999). Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Physiol* 277, L113-118.
- Garcia, A., Shankar, H., Murugappan, S., Kim, S., and Kunapuli, S. P. (2007). Regulation and functional consequences of ADP receptor-mediated Erk2 activation in platelets. *Biochem J*.
- Gentsch, M., Cui, L., Mengos, A., Chang, X. B., Chen, J. H., and Riordan, J. R. (2003). The PDZ-binding chloride channel ClC-3B localizes to the Golgi and associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-interacting PDZ proteins. *J Biol Chem* 278, 6440-6449.

- Gibson, L. E., and Cooke, R. E. (1959). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23, 545-549.
- Gibson, R. L., Burns, J. L., and Ramsey, B. W. (2003). Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 918-951.
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680-6684.
- Gilmore, T. D., and Herscovitch, M. (2006). Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene* 25, 6887-6899.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J., and Osborne, B. A. (2003). *Immunologie*, 4th edition edn (Paris, Dunod).
- Grubb, B. R., and Boucher, R. C. (1999). Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis. *Physiol Rev* 79, S193-214.
- Guggino, W. B. (2004). The cystic fibrosis transmembrane regulator forms macromolecular complexes with PDZ domain scaffold proteins. *Proc Am Thorac Soc* 1, 28-32.
- Guo, R. F., and Ward, P. A. (2002). Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model. *Free Radic Biol Med* 33, 303-310.
- Haardt, M., Benharouga, M., Lechardeur, D., Kartner, N., and Lukacs, G. L. (1999). C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* 274, 21873-21877.
- Hannun, Y. A. (1996). Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274, 1855-1859.
- Hansell, C. A., Simpson, C. V., and Nibbs, R. J. (2006). Chemokine sequestration by atypical chemokine receptors. *Biochem Soc Trans* 34, 1009-1013.
- Hayden, M. S., West, A. P., and Ghosh, S. (2006). NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758-6780.
- Homaidan, F. R., Chakroun, I., and El-Sabban, M. E. (2003). Regulation of nuclear factor-kappaB in intestinal epithelial cells in a cell model of inflammation. *Mediators Inflamm* 12, 277-283.
- Hoshino, M. (2006). [Airway inflammation and remodeling in bronchial asthma]. *Nippon Naika Gakkai Zasshi* 95, 1425-1430.
- Hu, B., Ullenbruch, M. R., Jin, H., Gharaee-Kermani, M., and Phan, S. H. (2007). An essential role for CCAAT/enhancer binding protein beta in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Pathol* 211, 455-462.

- Hubeau, C., Lorenzato, M., Couetil, J. P., Hubert, D., Dusser, D., Puchelle, E., and Gaillard, D. (2001). Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa. *Clin Exp Immunol* 124, 69-76.
- Hudson, V. M. (2004). New insights into the pathogenesis of cystic fibrosis: pivotal role of glutathione system dysfunction and implications for therapy. *Treat Respir Med* 3, 353-363.
- Jiang, Y., Woronicz, J. D., Liu, W., and Goeddel, D. V. (1999). Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283, 543-546.
- Joseph, T., Look, D., and Ferkol, T. (2005). NF-kappaB activation and sustained IL-8 gene expression in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelial cells stimulated with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288, L471-479.
- Jovov, B., Ismailov, II, Berdiev, B. K., Fuller, C. M., Sorscher, E. J., Dedman, J. R., Kaetzel, M. A., and Benos, D. J. (1995). Interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and outwardly rectified chloride channels. *J Biol Chem* 270, 29194-29200.
- Kabe, Y., Ando, K., Hirao, S., Yoshida, M., and Handa, H. (2005). Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal* 7, 395-403.
- Kanazawa, H., Hirata, K., and Yoshikawa, J. (2002). Involvement of vascular endothelial growth factor in exercise induced bronchoconstriction in asthmatic patients. *Thorax* 57, 885-888.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431-436.
- Karin, M., and Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* 5, 747-757.
- Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 240-246.
- Karin, M., Takahashi, T., Kapahi, P., Delhase, M., Chen, Y., Makris, C., Rothwarf, D., Baud, V., Natoli, G., Guido, F., and Li, N. (2001). Oxidative stress and gene expression: the AP-1 and NF-kappaB connections. *Biofactors* 15, 87-89.
- Kawaguchi, M., Kokubu, F., Huang, S. K., Homma, T., Odaka, M., Watanabe, S., Suzuki, S., Ieki, K., Matsukura, S., Kurokawa, M., and Adachi, M. (2007). The IL-17F signaling pathway is involved in the induction of IFN-gamma-inducible protein 10 in bronchial epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol*.
- Keane, M. P., Strieter, R. M., Lynch, J. P., 3rd, and Belperio, J. A. (2006). Inflammation and angiogenesis in fibrotic lung disease. *Semin Respir Crit Care Med* 27, 589-599.
- Kent, G., Iles, R., Bear, C. E., Huan, L. J., Griesenbach, U., McKerlie, C., Frndova, H., Ackerley, C., Gosselin, D., Radzioch, D., *et al.* (1997). Lung disease in mice with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 100, 3060-3069.

- Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M., and Tsui, L. C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* *245*, 1073-1080.
- Kerem, E. (2006). Atypical CF and CF related diseases. *Paediatr Respir Rev* *7 Suppl 1*, S144-146.
- Khan, T. Z., Wagener, J. S., Bost, T., Martinez, J., Accurso, F. J., and Riches, D. W. (1995). Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* *151*, 1075-1082.
- Kida, Y., Kobayashi, M., Suzuki, T., Takeshita, A., Okamatsu, Y., Hanazawa, S., Yasui, T., and Hasegawa, K. (2005). Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. *Cytokine* *29*, 159-168.
- Kim, S. K., Woodcroft, K. J., Oh, S. J., Abdelmegeed, M. A., and Novak, R. F. (2005). Role of mechanical and redox stress in activation of mitogen-activated protein kinases in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* *70*, 1785-1795.
- Kiselyov, A., Balakin, K. V., and Tkachenko, S. E. (2007). VEGF/VEGFR signalling as a target for inhibiting angiogenesis. *Expert Opin Investig Drugs* *16*, 83-107.
- Knorre, A., Wagner, M., Schaefer, H. E., Colledge, W. H., and Pahl, H. L. (2002). DeltaF508-CFTR causes constitutive NF-kappaB activation through an ER-overload response in cystic fibrosis lungs. *Biol Chem* *383*, 271-282.
- Kopito, R. R. (1999). Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev* *79*, S167-173.
- Korf, B. R. (2000). *Human Genetics: A problem-based approach*, Second Edition edn, blackwell Sciences).
- Kundu, J. K., Shin, Y. K., and Surh, Y. J. (2006). Resveratrol modulates phorbol ester-induced pro-inflammatory signal transduction pathways in mouse skin in vivo: NF-kappaB and AP-1 as prime targets. *Biochem Pharmacol* *72*, 1506-1515.
- Kunzelmann, K., Schreiber, R., Nitschke, R., and Mall, M. (2000). Control of epithelial Na⁺ conductance by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers Arch* *440*, 193-201.
- Kuwano, T., Nakao, S., Yamamoto, H., Tsuneyoshi, M., Yamamoto, T., Kuwano, M., and Ono, M. (2004). Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *Faseb J* *18*, 300-310.
- Kwok, R. P., Lundblad, J. R., Chrivia, J. C., Richards, J. P., Bachinger, H. P., Brennan, R. G., Roberts, S. G., Green, M. R., and Goodman, R. H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* *370*, 223-226.
- Laan, M., Bozinovski, S., and Anderson, G. P. (2004). Cigarette smoke inhibits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory cytokines by suppressing the activation of activator protein-1 in bronchial epithelial cells. *J Immunol* *173*, 4164-4170.

- Lai, W. K., and Adams, D. H. (2005). Angiogenesis and chronic inflammation; the potential for novel therapeutic approaches in chronic liver disease. *J Hepatol* 42, 7-11.
- Le, Y., Zhou, Y., Iribarren, P., and Wang, J. (2004). Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol* 1, 95-104.
- Lebowitz, J., Edinger, R. S., An, B., Perry, C. J., Onate, S., Kleyman, T. R., and Johnson, J. P. (2004). Ikappab kinase-beta (ikkbeta) modulation of epithelial sodium channel activity. *J Biol Chem* 279, 41985-41990.
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M., and Tjian, R. (1987). Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* 325, 368-372.
- Leon, M. L., and Zuckerman, S. H. (2005). Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. *Inflamm Res* 54, 395-411.
- Leonardi, A., Vito, P., Mauro, C., Pacifico, F., Ulianich, L., Consiglio, E., Formisano, S., and Di Jeso, B. (2002). Endoplasmic reticulum stress causes thyroglobulin retention in this organelle and triggers activation of nuclear factor-kappa B via tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Endocrinology* 143, 2169-2177.
- Li, J., Johnson, X. D., Iazvovskaia, S., Tan, A., Lin, A., and Hershenson, M. B. (2003). Signaling intermediates required for NF-kappa B activation and IL-8 expression in CF bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284, L307-315.
- Linton, M. F., and Fazio, S. (2004). Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 4, 116-123.
- Lora, J. M., Zhang, D. M., Liao, S. M., Burwell, T., King, A. M., Barker, P. A., Singh, L., Keaveney, M., Morgenstern, J., Gutierrez-Ramos, J. C., *et al.* (2005). Tumor necrosis factor-alpha triggers mucus production in airway epithelium through an IkappaB kinase beta-dependent mechanism. *J Biol Chem* 280, 36510-36517.
- Lowe, C. U., May, C. D., and Reed, S. C. (1949). Fibrosis of the pancreas in infants and children: a statistical study of clinical and hereditary features. *Am J Dis Child* 78, 349-374.
- Machen, T. E. (2006). Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory? *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C218-230.
- Macian, F., Lopez-Rodriguez, C., and Rao, A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20, 2476-2489.
- Majumdar, S., Lamothe, B., and Aggarwal, B. B. (2002). Thalidomide suppresses NF-kappa B activation induced by TNF and H2O2, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. *J Immunol* 168, 2644-2651.
- Malemud, C. J. (2007). Growth hormone, VEGF and FGF: involvement in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* 375, 10-19.

- Mall, M., Grubb, B. R., Harkema, J. R., O'Neal, W. K., and Boucher, R. C. (2004). Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med* 10, 487-493.
- Matos, T. J., Duarte, C. B., Goncalo, M., and Lopes, M. C. (2005). Role of oxidative stress in ERK and p38 MAPK activation induced by the chemical sensitizer DNFB in a fetal skin dendritic cell line. *Immunol Cell Biol* 83, 607-614.
- Matsui, H., Grubb, B. R., Tarran, R., Randell, S. H., Gatzky, J. T., Davis, C. W., and Boucher, R. C. (1998). Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95, 1005-1015.
- McColley, S. A., Stellmach, V., Boas, S. R., Jain, M., and Crawford, S. E. (2000). Serum vascular endothelial growth factor is elevated in cystic fibrosis and decreases with treatment of acute pulmonary exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 161, 1877-1880.
- McDonald, D. M. (2001). Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 164, S39-45.
- Morral, N., Bertranpetit, J., Estivill, X., Nunes, V., Casals, T., Gimenez, J., Reis, A., Varon-Mateeva, R., Macek, M., Jr., Kalaydjieva, L., and et al. (1994). The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet* 7, 169-175.
- Morris, M. R., Doull, I. J., Dewitt, S., and Hallett, M. B. (2005). Reduced iC3b-mediated phagocytotic capacity of pulmonary neutrophils in cystic fibrosis. *Clin Exp Immunol* 142, 68-75.
- Mossman, B. T., Lounsbury, K. M., and Reddy, S. P. (2006). Oxidants and signaling by mitogen-activated protein kinases in lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34, 666-669.
- Mukhopadhyay, S., Hoidal, J. R., and Mukherjee, T. K. (2006). Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res* 7, 125.
- Muselet-Charlier, C., Roque, T., Boncoeur, E., Chadelat, K., Clement, A., Jacquot, J., and Tabary, O. (2007). Enhanced IL-1beta-induced IL-8 production in cystic fibrosis lung epithelial cells is dependent of both mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 402-407.
- Nanua, S., Sajjan, U., Keshavjee, S., and Hershenson, M. B. (2006). Absence of typical unfolded protein response in primary cultured cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 135-143.
- Nguyen, C., Teo, J. L., Matsuda, A., Eguchi, M., Chi, E. Y., Henderson, W. R., Jr., and Kahn, M. (2003). Chemogenomic identification of Ref-1/AP-1 as a therapeutic target for asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1169-1173.
- Noah, T. L., Black, H. R., Cheng, P. W., Wood, R. E., and Leigh, M. W. (1997). Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis. *J Infect Dis* 175, 638-647.
- Ogretmen, B., and Hannun, Y. A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 4, 604-616.

- Olivier, S., Robe, P., and Bours, V. (2006). Can NF-kappaB be a target for novel and efficient anti-cancer agents? *Biochem Pharmacol* 72, 1054-1068.
- Oppenheimer, E. H., and Esterly, J. R. (1975). Pathology of cystic fibrosis review of the literature and comparison with 146 autopsied cases. *Perspect Pediatr Pathol* 2, 241-278.
- Ornoy, A., Arnon, J., Katznelson, D., Granat, M., Caspi, B., and Chemke, J. (1987). Pathological confirmation of cystic fibrosis in the fetus following prenatal diagnosis. *Am J Med Genet* 28, 935-947.
- Ozaki, K., and Leonard, W. J. (2002). Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem* 277, 29355-29358.
- Papaioannou, A. I., Kostikas, K., Kollia, P., and Gourgoulisanis, K. I. (2006). Clinical implications for vascular endothelial growth factor in the lung: friend or foe? *Respir Res* 7, 128.
- Parad, R. B., and Comeau, A. M. (2005). Diagnostic dilemmas resulting from the immunoreactive trypsinogen/DNA cystic fibrosis newborn screening algorithm. *J Pediatr* 147, S78-82.
- Pardo, A., and Selman, M. (2006). Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc* 3, 383-388.
- Park, G. Y., and Christman, J. W. (2006). Involvement of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in the molecular pathogenesis of inflammatory lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L797-805.
- Park, K. A., Byun, H. S., Won, M., Yang, K. J., Shin, S., Piao, L., Kim, J. M., Yoon, W. H., Junn, E., Park, J., *et al.* (2007). Sustained activation of protein kinase C downregulates nuclear factor-kappaB signaling by dissociation of IKK-gamma and Hsp90 complex in human colonic epithelial cells. *Carcinogenesis* 28, 71-80.
- Park, M., Ko, S. B., Choi, J. Y., Muallem, G., Thomas, P. J., Pushkin, A., Lee, M. S., Kim, J. Y., Lee, M. G., Muallem, S., and Kurtz, I. (2002). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator interacts with and regulates the activity of the HCO₃⁻ salvage transporter human Na⁺-HCO₃⁻ cotransport isoform 3. *J Biol Chem* 277, 50503-50509.
- Parsons, E. P., Clarke, A. J., and Bradley, D. M. (2003). Implications of carrier identification in newborn screening for cystic fibrosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 88, F467-471.
- Pascual, G., and Glass, C. K. (2006). Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol Metab* 17, 321-327.
- Perez, A., Issler, A. C., Cotton, C. U., Kelley, T. J., Verkman, A. S., and Davis, P. B. (2007). CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L383-395.
- Petrovic, N., Knight, D. A., Bomalaski, J. S., Thompson, P. J., and Misso, N. L. (2006). Concomitant activation of extracellular signal-regulated kinase and induction of COX-2 stimulates maximum prostaglandin E2 synthesis in human airway epithelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 81, 126-135.

- Pfeffer, K. D., Huecksteadt, T. P., and Hoidal, J. R. (1993). Expression and regulation of tumor necrosis factor in macrophages from cystic fibrosis patients. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9, 511-519.
- Pham, C. T. (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol* 6, 541-550.
- Pier, G. B. (2000). Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8822-8828.
- Pier, G. B. (2002). CFTR mutations and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Curr Opin Microbiol* 5, 81-86.
- Pier, G. B., Grout, M., Zaidi, T., Meluleni, G., Mueschenborn, S. S., Banting, G., Ratcliff, R., Evans, M. J., and Colledge, W. H. (1998). *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393, 79-82.
- Pier, G. B., Grout, M., and Zaidi, T. S. (1997). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12088-12093.
- Pilewski, J. M., and Frizzell, R. A. (1999). Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev* 79, S215-255.
- Pittet, J. F., Lee, H., Pespeni, M., O'Mahony, A., Roux, J., and Welch, W. J. (2005). Stress-induced inhibition of the NF-kappaB signaling pathway results from the insolubilization of the IkappaB kinase complex following its dissociation from heat shock protein 90. *J Immunol* 174, 384-394.
- Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., Stafforini, D. M., and McIntyre, T. M. (2000). Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 69, 419-445.
- Prince, L. S., Workman, R. B., Jr., and Marchase, R. B. (1994). Rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5192-5196.
- Quinton, P. M. (1983). Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 301, 421-422.
- Rahman, I., and Adcock, I. M. (2006). Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 28, 219-242.
- Rannou, F., Francois, M., Corvol, M. T., and Berenbaum, F. (2006). Cartilage breakdown in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 73, 29-36.
- Rao, S., and Grigg, J. (2006). New insights into pulmonary inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 91, 786-788.
- Ratjen, F., and Doring, G. (2003). Cystic fibrosis. *Lancet* 361, 681-689.

- Ratjen, F., Hartog, C. M., Paul, K., Wermelt, J., and Braun, J. (2002). Matrix metalloproteases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha. *Thorax* 57, 930-934.
- Raymond, L., Eck, S., Mollmark, J., Hays, E., Tomek, I., Kantor, S., Elliott, S., and Vincenti, M. (2006). Interleukin-1 beta induction of matrix metalloproteinase-1 transcription in chondrocytes requires ERK-dependent activation of CCAAT enhancer-binding protein-beta. *J Cell Physiol* 207, 683-688.
- Ribeiro, C. M., Paradiso, A. M., Carew, M. A., Shears, S. B., and Boucher, R. C. (2005a). Cystic fibrosis airway epithelial Ca²⁺ signaling: the mechanism for the larger agonist-mediated Ca²⁺ signals in human cystic fibrosis airway epithelia. *J Biol Chem* 280, 10202-10209.
- Ribeiro, C. M., Paradiso, A. M., Schwab, U., Perez-Vilar, J., Jones, L., O'Neal, W., and Boucher, R. C. (2005b). Chronic airway infection/inflammation induces a Ca²⁺-dependent hyperinflammatory response in human cystic fibrosis airway epithelia. *J Biol Chem* 280, 17798-17806.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L., and et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066-1073.
- Rollins, B. J. (1997). Chemokines. *Blood* 90, 909-928.
- Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., Drumm, M. L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J. L., Kennedy, D., Hidaka, N., and et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245, 1059-1065.
- Rosenfeld, M., Gibson, R. L., McNamara, S., Emerson, J., Burns, J. L., Castile, R., Hiatt, P., McCoy, K., Wilson, C. B., Inglis, A., et al. (2001). Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 32, 356-366.
- Roth, M., and Black, J. L. (2006). Transcription factors in asthma: are transcription factors a new target for asthma therapy? *Curr Drug Targets* 7, 589-595.
- Rowe, S. M., Miller, S., and Sorscher, E. J. (2005). Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 352, 1992-2001.
- Rundhaug, J. E. (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9, 267-285.
- Saadane, A., Masters, S., Didonato, J., Li, J., and Berger, M. (2007). Parthenolide Inhibits I{ κ } B Kinase, NF- κ B Activation and Inflammatory Response in CF Cells and Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*.
- Saadane, A., Soltys, J., and Berger, M. (2005). Role of IL-10 deficiency in excessive nuclear factor-kappaB activation and lung inflammation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice. *J Allergy Clin Immunol* 115, 405-411.
- Saadane, A., Soltys, J., and Berger, M. (2006). Acute Pseudomonas challenge in cystic fibrosis mice causes prolonged nuclear factor-kappa B activation, cytokine secretion, and persistent lung inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 117, 1163-1169.

- Scheidereit, C. (2006). IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 25, 6685-6705.
- Schoonbroodt, S., Ferreira, V., Best-Belpomme, M., Boelaert, J. R., Legrand-Poels, S., Korner, M., and Piette, J. (2000). Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I kappa B alpha in NF-kappa B activation by an oxidative stress. *J Immunol* 164, 4292-4300.
- Sebkova, L., Pellicano, A., Monteleone, G., Grazioli, B., Guarnieri, G., Imeneo, M., Pallone, F., and Lizza, F. (2004). Extracellular signal-regulated protein kinase mediates interleukin 17 (IL-17)-induced IL-8 secretion in Helicobacter pylori-infected human gastric epithelial cells. *Infect Immun* 72, 5019-5026.
- Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-716.
- Sermet-Gaudelus, I., Roussel, D., Bui, S., Deneuille, E., Huet, F., Reix, P., Bellon, G., Lenoir, G., and Edelman, A. (2006). The CF-CIRC study: a French collaborative study to assess the accuracy of cystic fibrosis diagnosis in neonatal screening. *BMC Pediatr* 6, 25.
- Seumois, G., Fillet, M., Gillet, L., Faccineto, C., Desmet, C., Francois, C., Dewals, B., Oury, C., Vanderplasschen, A., Lekeux, P., and Bureau, F. (2007). De novo C16- and C24-ceramide generation contributes to spontaneous neutrophil apoptosis. *J Leukoc Biol*.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20, 2390-2400.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4, E131-136.
- Singh, N. N., and Ramji, D. P. (2006). The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 487-499.
- Smith, J. J., Travis, S. M., Greenberg, E. P., and Welsh, M. J. (1996). Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85, 229-236.
- Sohn, M. H., Lee, K. E., Kim, K. W., Kim, E. S., Park, J. Y., and Kim, K. E. (2007). Calcium-Calmodulin Mediates House Dust Mite-Induced ERK Activation and IL-8 Production in Human Respiratory Epithelial Cells. *Respiration*.
- Southern, K. W., Munck, A., Pollitt, R., Travert, G., Zanolla, L., Dankert-Roelse, J., and Castellani, C. (2007). A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros* 6, 57-65.
- Sreenivasan, Y., Sarkar, A., and Manna, S. K. (2003). Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor-kappa B and activator protein-1 and potentiates apoptosis induced by ceramide. *Biochem Pharmacol* 66, 2223-2239.
- Starner, T. D., and McCray, P. B., Jr. (2005). Pathogenesis of early lung disease in cystic fibrosis: a window of opportunity to eradicate bacteria. *Ann Intern Med* 143, 816-822.

Stutts, M. J., Canessa, C. M., Olsen, J. C., Hamrick, M., Cohn, J. A., Rossier, B. C., and Boucher, R. C. (1995). CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269, 847-850.

Szabo, K., Szakacs, G., Hegeds, T., and Sarkadi, B. (1999). Nucleotide occlusion in the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Different patterns in the two nucleotide binding domains. *J Biol Chem* 274, 12209-12212.

Szeifert, G. T., Szabo, M., and Papp, Z. (1985). Morphology of cystic fibrosis at 17 weeks of gestation. *Clin Genet* 28, 561-565.

Tabary, O., Boncoeur, E., de Martin, R., Pepperkok, R., Clement, A., Schultz, C., and Jacquot, J. (2005). Calcium-dependent regulation of NF-(kappa)B activation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell Signal*.

Tabary, O., Corvol, H., Boncoeur, E., Chadelat, K., Fitting, C., Cavaillon, J. M., Clement, A., and Jacquot, J. (2006). Adherence of airway neutrophils and inflammatory response are increased in CF airway epithelial cell-neutrophil interactions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L588-596.

Tabary, O., Escotte, S., Couetil, J. P., Hubert, D., Dusser, D., Puchelle, E., and Jacquot, J. (2000). High susceptibility for cystic fibrosis human airway gland cells to produce IL-8 through the I kappa B kinase alpha pathway in response to extracellular NaCl content. *J Immunol* 164, 3377-3384.

Tabary, O., Escotte, S., Couetil, J. P., Hubert, D., Dusser, D., Puchelle, E., and Jacquot, J. (2001). Relationship between IkappaBalpha deficiency, NFkappaB activity and interleukin-8 production in CF human airway epithelial cells. *Pflugers Arch* 443 Suppl 1, S40-44.

Tabary, O., Muselet, C., Escotte, S., Antonicelli, F., Hubert, D., Dusser, D., and Jacquot, J. (2003). Interleukin-10 inhibits elevated chemokine interleukin-8 and regulated on activation normal T cell expressed and secreted production in cystic fibrosis bronchial epithelial cells by targeting the I(k)B kinase alpha/beta complex. *Am J Pathol* 162, 293-302.

Tabary, O., Zahm, J. M., Hinrasky, J., Couetil, J. P., Cornillet, P., Guenounou, M., Gaillard, D., Puchelle, E., and Jacquot, J. (1998). Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 153, 921-930.

Taggart, C., Coakley, R. J., Grealley, P., Canny, G., O'Neill, S. J., and McElvaney, N. G. (2000). Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278, L33-41.

Terheggen-Lagro, S. W., Rijkers, G. T., and van der Ent, C. K. (2005). The role of airway epithelium and blood neutrophils in the inflammatory response in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 4 Suppl 2, 15-23.

Thimmulappa, R. K., Scollick, C., Traore, K., Yates, M., Trush, M. A., Liby, K. T., Sporn, M. B., Yamamoto, M., Kensler, T. W., and Biswal, S. (2006). Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 883-889.

Thomaidis, T. S., and Arey, J. B. (1963). The Intestinal Lesions in Cystic Fibrosis of the Pancreas. *J Pediatr* 63, 444-453.

- Thomas, L. H., Wickremasinghe, M. I., and Friedland, J. S. (2007). IL-1 beta stimulates divergent upper and lower airway epithelial cell CCL5 secretion. *Clin Immunol* 122, 229-238.
- Thompson, C., Cloutier, A., Bosse, Y., Thivierge, M., Gouill, C. L., Larivee, P., McDonald, P. P., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2006). CysLT1 receptor engagement induces activator protein-1- and NF-kappaB-dependent IL-8 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35, 697-704.
- Tirouvanziam, R., de Bentzmann, S., Hubeau, C., Hinnrasky, J., Jacquot, J., Peault, B., and Puchelle, E. (2000). Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23, 121-127.
- Tosi, M. F., Zakem, H., and Berger, M. (1990). Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized pseudomonas as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. *J Clin Invest* 86, 300-308.
- Uehara, K., Miura, S., Takeuchi, T., Taki, T., Nakashita, M., Adachi, M., Inamura, T., Ogawa, T., Akiba, Y., Suzuki, H., *et al.* (2003). Significant role of ceramide pathway in experimental gastric ulcer formation in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 305, 232-239.
- Valdes, J. A., Hidalgo, J., Galaz, J. L., Puentes, N., Silva, M., Jaimovich, E., and Carrasco, M. A. (2007). Nf-Kb Activation by Depolarization of Skeletal Muscle Cells Depends on Ryanodine and Ip3 Receptors-Mediated Calcium Signals. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Venkatakrisnan, A., Stecenko, A. A., King, G., Blackwell, T. R., Brigham, K. L., Christman, J. W., and Blackwell, T. S. (2000). Exaggerated activation of nuclear factor-kappaB and altered IkappaB-beta processing in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23, 396-403.
- Verrecchia, F., Vindevoghel, L., Lechleider, R. J., Uitto, J., Roberts, A. B., and Mauviel, A. (2001). Smad3/AP-1 interactions control transcriptional responses to TGF-beta in a promoter-specific manner. *Oncogene* 20, 3332-3340.
- Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V., and Chariot, A. (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 30, 43-52.
- Volanti, C., Matroule, J. Y., and Piette, J. (2002). Involvement of oxidative stress in NF-kappaB activation in endothelial cells treated by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 75, 36-45.
- Wang, X., Venable, J., LaPointe, P., Hutt, D. M., Koulov, A. V., Coppinger, J., Gurkan, C., Kellner, W., Matteson, J., Plutner, H., *et al.* (2006). Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell* 127, 803-815.
- Watt, A. P., Courtney, J., Moore, J., Ennis, M., and Elborn, J. S. (2005). Neutrophil cell death, activation and bacterial infection in cystic fibrosis. *Thorax* 60, 659-664.
- Weber, A. J., Soong, G., Bryan, R., Saba, S., and Prince, A. (2001). 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.

- Wilson, J. W., and Robertson, C. F. (2002). Angiogenesis in paediatric airway disease. *Paediatr Respir Rev* 3, 219-229.
- Wine, J. J. (1999). The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* 103, 309-312.
- Wiszniewski, L., Jornot, L., Dudez, T., Pagano, A., Rochat, T., Lacroix, J. S., Suter, S., and Chanson, M. (2006). Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34, 39-48.
- Wright, J. G., and Christman, J. W. (2003). The role of nuclear factor kappa B in the pathogenesis of pulmonary diseases: implications for therapy. *Am J Respir Med* 2, 211-219.
- Ye, S., Patodi, N., Walker-Bone, K., Reading, I., Cooper, C., and Dennison, E. (2007). Variation in the matrix metalloproteinase-3, -7, -12 and -13 genes is associated with functional status in rheumatoid arthritis. *Int J Immunogenet* 34, 81-85.
- Yoo, D., Flagg, T. P., Olsen, O., Raghuram, V., Foskett, J. K., and Welling, P. A. (2004). Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J Biol Chem* 279, 6863-6873.
- Yoshimura, H., Nakahama, K., Safronova, O., Tanaka, N., Muneta, T., and Morita, I. (2006). Transforming growth factor-beta stimulates IL-1beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human synovial cells via the ERK/AP-1 pathway. *Inflamm Res*.
- Zabner, J., Scheetz, T. E., Almabrazi, H. G., Casavant, T. L., Huang, J., Keshavjee, S., and McCray, P. B., Jr. (2005). CFTR DeltaF508 mutation has minimal effect on the gene expression profile of differentiated human airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289, L545-553.
- Zabner, J., Smith, J. J., Karp, P. H., Widdicombe, J. H., and Welsh, M. J. (1998). Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro. *Mol Cell* 2, 397-403.
- Zaman, M. M., Gelrud, A., Junaidi, O., Regan, M. M., Warny, M., Shea, J. C., Kelly, C., O'Sullivan, B. P., and Freedman, S. D. (2004). Interleukin 8 secretion from monocytes of subjects heterozygous for the deltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutation is altered. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 819-824.
- Zhang, D. D. (2006). Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev* 38, 769-789.
- Zhang, Y., Feng, X. H., and Derynck, R. (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* 394, 909-913.
- Zhou, Z., Wang, X., Li, M., Sohma, Y., Zou, X., and Hwang, T. C. (2005). High affinity ATP/ADP analogues as new tools for studying CFTR gating. *J Physiol* 569, 447-457.
- Zhou, Z., Wang, X., Liu, H. Y., Zou, X., Li, M., and Hwang, T. C. (2006). The two ATP binding sites of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) play distinct roles in gating kinetics and energetics. *J Gen Physiol* 128, 413-422.

Zumbansen, M., and Stoffel, W. (1997). Tumor necrosis factor alpha activates NF-kappaB in acid sphingomyelinase-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 272, 10904-10909.

Résumé

L'atteinte pulmonaire est la première cause de décès chez les personnes souffrant de mucoviscidose. Cette détérioration pulmonaire résulte d'infections récurrentes et de l'inflammation chronique concomitante. Encore aujourd'hui, une zone d'ombre subsiste quant à l'origine de cette inflammation. Le but de notre étude était de mettre en évidence un état inflammatoire intrinsèque dans les cellules épithéliales mucoviscidosiques et d'étudier les mécanismes moléculaires conduisant à cette réaction inflammatoire. Nous avons montré dans un premier temps une expression accrue de protéines pro-inflammatoires dans les poumons d'un fœtus homozygote pour la mutation $\Delta F508$ comparée à l'expression observée dans les poumons de fœtus contrôles. Cette sur-expression de molécules pro-inflammatoires a été confirmée dans différents modèles de cellules mucoviscidosiques. Nous avons également démontré la présence d'une activation constitutive de AP-1 ainsi que de NF- κ B dans les cellules mucoviscidosique via, respectivement, l'activation des kinases ERK et IKK. L'inhibition de ces deux kinases, nous a permis d'identifier un grand nombre de gènes pro-inflammatoires régulés majoritairement par ces facteurs de transcription. Nous avons également démontré que l'inhibition de l'IL-1 β et du bFGF, deux protéines inflammatoires sur-exprimées dans les cellules mucoviscidosiques, diminuait la sur-expression de plusieurs molécules pro-inflammatoires. Les chimiokines Gro- α , Gro- β , Gro- γ , IL-8 et ENA-78 ou les facteurs de croissances VEGF et bFGF sécrétés par les cellules épithéliales mucoviscidosiques sont également connus pour être des facteurs pro-angiogènes. Nous avons, dès lors, démontré que le milieu de culture provenant de cellules mucoviscidosiques était capable d'induire la prolifération, la migration et le bourgeonnement de cellules endothéliales primaires. Ces différents résultats nous amènent à la conclusion que l'absence de canal CFTR fonctionnel à la membrane plasmique induit une activation intrinsèque de AP-1 et de NF- κ B. L'activation de ces deux facteurs conduit à un état inflammatoire amplifié par la présence d'IL-1 β et de bFGF mais également par un processus angiogène généré par les cellules épithéliales mucoviscidosiques.

Summary

While multiple organs are affected in cystic fibrosis (CF) patients, chronic lung disease is the most severe clinical manifestation caused by chronic bacterial infection and concomitant airway inflammation. The sequence of events at the onset of pulmonary infection and inflammation is controversial and not fully characterized. The aim of this work was to highlight an early inflammatory state in CF airways before any infection and to investigate the molecular mechanisms underlying this intrinsic inflammation. We showed increased levels of pro-inflammatory proteins in the lungs of a CF fetus compared to the lungs of two normal fetuses. Using different CF cell models, we confirmed the over-production of numerous pro-inflammatory molecules. We then demonstrated that the transcription of these inflammatory genes is NF- κ B and AP-1-dependent and that these transcription factors are activated through IKK and ERK kinase activation. We also identified that the IL-1 β and bFGF inhibition, two pro-inflammatory proteins over-expressed in our CF models, decreased the expression of several pro-inflammatory genes. Among the molecules over-secreted by CF epithelial cells, chemokines such as IL-8, Gro- α , Gro- β , Gro- γ and ENA-78 or growth factors such as VEGF and bFGF are known to be pro-angiogenic factors. We further demonstrated that conditioned media from CF epithelial cells were able to induce proliferation, migration and sprouting of cultured primary endothelial cells. Our data demonstrated that the absence of CFTR (CF transmembrane conductance regulator) at the plasma membrane leads to an intrinsic AP-1 and NF- κ B activation. These activations lead to a pro-inflammatory state sustained through autocrine factor secretion and also through the angiogenic process induced by CF epithelial cells.