

Université de Montréal

**Inflammation intestinale associée à la fibrose kystique :
Rôle du CFTR et propriétés anti-inflammatoires de la vitamine D**

par

Karoline St-Martin Crites

Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Sciences biomédicales
Option générale

Septembre 2014

© Karoline St-Martin Crites, 2014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Inflammation intestinale associée à la fibrose kystique :
Rôle du CFTR et propriétés anti-inflammatoires de la vitamine D**

Présenté par :

Karoline St-Martin Crites

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur :

Emmanuelle Brochiero

Directrice de recherche :

Geneviève Mailhot

Membre du jury :

Christine Des Rosiers

Résumé

Les patients fibrose kystique (FK) souffrent de complications digestives qui incluent une inflammation intestinale modérée dont l'étiologie est méconnue. Les personnes atteintes de FK présentent également une malabsorption des vitamines liposolubles, telles la vitamine D. Or, la vitamine D possède des propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires. Le présent projet vise à investiguer le rôle du CFTR, dont le gène est muté dans la FK, dans l'étiologie de cette inflammation intestinale et à étudier le potentiel anti-inflammatoire de la vitamine D sur celle-ci. Le CFTR a été invalidé génétiquement par la méthode des ARN interférents (shRNAi) et/ou inhibé pharmacologiquement par l'utilisation d'un antagoniste inhibiteur spécifique (CFTRinh-172). Un état inflammatoire a été induit par les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β . Afin d'évaluer le rôle anti-inflammatoire de la vitamine D, les cellules ont été pré-traitées avec la forme bioactive de la vitamine D, la 1,25(OH) $_2$ D $_3$. La sécrétion et l'expression génique d'interleukine-8, ainsi que l'activation de la voie de signalisation p38MAPK et du facteur de transcription NF κ B ont été évaluées. Pour explorer la voie par laquelle la vitamine D exerce ses actions anti-inflammatoires, les cellules ont été pré-incubées avec le BIRB796 pour inhiber la voie p38MAPK. Finalement l'expression génique du récepteur nucléaire de la vitamine D et des hydroxylases intestinales impliquées dans son métabolisme a été déterminée. Nos résultats suggèrent que le CFTR a un rôle dans l'étiologie de l'inflammation intestinale associée à la FK. De plus, la vitamine D semble moduler à la baisse la réponse inflammatoire de la cellule intestinale dont le CFTR a été génétiquement invalidé.

Mots-clés : Fibrose kystique, inflammation intestinale, CFTR, Interleukine-8, vitamine D

Abstract

Cystic fibrosis (CF) patients suffer from various digestive complications including moderate intestinal inflammation which etiology is unknown. Individuals with CF also display malabsorption of fat-soluble vitamins; including vitamin D. Vitamin D is a hormone that has immunomodulatory and anti-inflammatory properties. This project aims to investigate the role of CFTR, the mutated gene in CF, in the etiology of CF-related intestinal inflammation and to study the anti-inflammatory potential of vitamin D at this level. CFTR was genetically depleted by means of short hairpin RNA interference (shRNAi) and/or pharmacologically inhibited by the use of a specific inhibitor (CFTRinh-172). An inflammatory state was induced by pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . To evaluate the anti-inflammatory role of vitamin D, cells have been pre-treated with the bioactive form of vitamin D, 1,25(OH) $_2$ D $_3$. The secretion and gene expression of interleukin-8, as well as the activation of the p38MAPK signaling pathway and the NF κ B transcription factor were assessed. To explore how vitamin D exerts its anti-inflammatory actions, cells were incubated with the BIRB796 to inhibit the p38MAPK pathway. Finally, gene expression of the vitamin D nuclear receptor and the intestinal hydroxylases involved in vitamin D metabolism were assessed. Our results suggest that CFTR plays a role in the etiology of intestinal inflammation associated with CF and that vitamin D reduces the inflammatory responses of CFTR knockdown cells.

Keywords : Cystic fibrosis, intestinal inflammation, CFTR, Interleukin-8, Vitamin D

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xvi

Introduction	17
---------------------------	-----------

Chapitre 1: Recension des écrits	18
---	-----------

1.1 L'intestin.....	18
----------------------------	-----------

1.1.1 Anatomie et histologie intestinale.....	18
--	-----------

1.1.1.1 Anatomie.....	18
-----------------------	----

a) Duodénum	18
-------------------	----

b) Jéjunum	18
------------------	----

c) L'iléon.....	18
-----------------	----

1.1.1.2 Histologie.....	19
-------------------------	----

1.1.1.2.1 Paroi intestinale	19
-----------------------------------	----

1.1.2 Physiologie	22
--------------------------------	-----------

1.1.2.1 Absorption	22
--------------------------	----

1.1.2.2 Défense immunitaire	22
-----------------------------------	----

1.1.2.2.1 La réponse immunitaire et inflammatoire	24
---	----

a) La réponse immunitaire innée	24
---------------------------------------	----

b) La réponse immunitaire acquise	24
---	----

1.2 Le CFTR.....	25
-------------------------	-----------

1.2.1 Structure.....	25
-----------------------------	-----------

1.2.1.1 Le gène.....	25
----------------------	----

1.2.1.2 La protéine	26
1.2.2 Expression du CFTR	26
1.2.3 Rôles du CFTR.....	27
a) Canal Chlorure (Cl-) et régulation du fonctionnement des autres canaux ioniques	27
b) Protéine multifonctionnelle	27
1.3 La fibrose kystique	28
1.3.1 Définition de la maladie et prévalence	28
1.3.2 Étiologie	29
1.3.2.1 Les mutations du gène CFTR	29
1.3.3 Symptômes.....	29
1.3.3.1 Généralités	29
1.3.3.2 Manifestations gastro-intestinales: Physiopathologie.....	30
a) Pancréas	30
b) Intestin grêle	31
c) Foie	31
1.3.4 Autres manifestations	32
1.3.4.1 Dysbiose du microbiote intestinal	32
1.3.4.2 L'inflammation intestinale liée à la fibrose kystique	32
1.4 La vitamine D	34
1.4.1 Métabolisme global	34
1.4.2 Rôles classiques de la vitamine D	36
1.4.3 Vitamine D et intestin	37
1.4.3.1 Métabolisme intestinal	37
1.4.3.2 Rôles intra-intestinaux	38
1.4.3.2.1 Propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires	38
1.4.3.2.2 Perméabilités intestinales.....	39
1.4.4 Vitamine D et Fibrose kystique	40

Chapitre 2: Problématique, hypothèses et objectifs	42
2.1 Problématique	42
2.2 Hypothèse et Objectifs	43
Chapitre 3: Matériels et Méthodes	44
3.1 Culture des cellules intestinales Caco-2/15	44
3.2 Traitements des cellules intestinales	44
3.2.1 Manipulation du CFTR.....	44
3.2.1.1 Invalidation génique du CFTR	44
i) Production des lentivirus	45
ii) Infection des cellules	46
iii) Amplification	46
3.2.1.2 Inhibition pharmacologique du CFTR.....	46
3.2.1.3 Double inhibition du CFTR	47
3.2.1.4 Activation du CFTR	47
3.2.2 Induction d'un état pro-inflammatoire.....	47
3.2.3 Traitement à la vitamine D	48
3.2.4 Inhibition de la voie p38MAPK.....	48
3.3 Essai de prolifération cellulaire par le test MTT	48
3.4 Analyse de l'expression génique	49
3.4.1 Extraction et dosage des ARN totaux.....	49
3.4.2 Transcription inverse (RT).....	49
3.4.3 Réaction en chaîne par polymérase (PCR) et révélation	49
3.5 Analyse de l'expression protéique	51
3.5.1 Extraction des protéines totales	51
3.5.2 Préparation des échantillons	51
3.5.3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	52
3.5.4 Transfert sur membrane PVDF.....	52
3.5.5 Immunodétection et révélation	52

3.6 Immunofluorescence	54
3.7 Réaction immuno-enzymatique de type ELISA	54
3.8 Statistiques	55
Chapitre 4: Résultats	56
4.1 Rôle du CFTR comme facteur étiologique de l'inflammation intestinale liée à la FK	56
4.1.1 Validation du modèle d'inactivation génique du CFTR.....	56
4.1.2 Impact de la manipulation du CFTR sur le profil inflammatoire de la cellule Caco-2/15	57
a) Sécrétion d'interleukine-8	57
b) Expression génique d'IL-8	60
c) Expression et niveau de phosphorylation de la voie p38MAPK	61
d) Expression et niveau de phosphorylation du facteur de transcription NFκB	63
4.2 Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur le profil inflammatoire de la cellule Caco-2/15 suite à la manipulation du CFTR	65
a) Sécrétion d'interleukine-8	65
b) Expression génique d'IL-8	70
c) Expression et niveau de phosphorylation de la voie p38MAPK	71
d) Inhibition de la phosphorylation de p38MAPK	74
e) Expression et niveau de la phosphatase-1 MAPK (MKP-1)	78
f) Expression et niveau de phosphorylation du facteur de transcription NFκB.....	80
g) Expression du récepteur nucléaire de la vitamine D et des hydroxylases intestinales impliquées dans son métabolisme	81
1) CYP24	82
2) CYP27B1	84
3) Récepteur nucléaire de la vitamine D (VDR).....	85

Chapitre 5: Discussion	89
5.1 Modèle cellulaire Caco-2/15	89
5.2 Manipulation du CFTR et profil inflammatoire de la cellule Caco-2/15	91
5.3 Actions anti-inflammatoires de la vitamine D	98
5.4 Forces et limites	107
Chapitre 6: Perspectives futures et Conclusion	109
Bibliographie	111
Annexes	i

Liste des tableaux

Tableau 1. Condition de PCR pour les cellules Caco-2/15

Tableau 2. Liste des anticorps utilisés pour les Western blot

Liste des figures

Figure 1: Système digestif

Figure 2: Structure de la paroi intestinale

Figure 3: Structure de la muqueuse intestinale

Figure 4: Organisation des cellules de l'intestin grêle

Figure 5: Le système immunitaire intestinal

Figure 6: Structure du CFTR

Figure 7 : Mécanisme de sécrétion du chlore par les cellules des cryptes intestinales.

Figure 8: Les grandes étapes de la biosynthèse de la vitamine D

Figure 9: Expression génique et protéique du CFTR dans les cellules Caco-2/15 infectées avec des shRNAs contre le CFTR.

Figure 10: Sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 par les cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été manipulé.

Figure 11: Expression génique de l'IL-8 des Caco-2/15 dont le CFTR a été manipulé.

Figure 12: Effet de la manipulation du CFTR sur la phosphorylation de p38MAPK.

Figure 13: Effet de l'inactivation génique du CFTR sur l'expression protéique de la forme phosphorylée et totale du facteur de transcription NFκB.

Figure 14: Effet de la 1,25 (OH)₂D₃ sur la sécrétion d'IL-8 par les cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été manipulé et stimulées par l'inducteur pro-inflammatoire TNF-α.

Figure 15: Effet de la 1,25 (OH)₂D₃ sur la sécrétion d'IL-8 par les cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été manipulé et stimulées par l'inducteur pro-inflammatoire IL-1β.

Figure 16: Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur l'expression génique de l'IL-8 des Caco-2/15 dont le CFTR a été modifié.

Figure 17: Effet de la 1,25 (OH)₂D₃ sur la phosphorylation de p38MAPK suite à la modification du CFTR des Caco-2/15.

Figure 18: Courbe dose-réponse de BIRB796 sur la phosphorylation de p38MAPK au sein de cellules Caco-2/15. Test de MTT avec BIRB796 pour viabilité cellulaire.

Figure 19: Effet de l'inhibiteur BIRB796 sur la sécrétion d'IL-8 en réponse à l'IL-1β des cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été manipulé.

Figure 20: Effet de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur l'expression de MKP-1 suite à la modification du CFTR des Caco-2/15.

Figure 21: Effet de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur l'expression de la forme phosphorylée du facteur de transcription NF κ B.

Figure 22: Expression génique de CYP24 des Caco-2/15 dont le CFTR a été modifié.

Figure 23: Expression génique de CYP27B1 des Caco-2/15 dont le CFTR a été modifié.

Figure 24: Expression génique du VDR des Caco-2/15 dont le CFTR a été modifié.

Figure 25: Schémas récapitulants les principaux résultats de l'étude.

Liste des abréviations

ABC: ATP Binding Cassette

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ADNc: Acide Désoxyribonucléique complémentaire

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm: Acide Ribonucléique messenger

ATP: Adénosine Triphosphate

BIRB 796: Doramapimod

Caco-2: Lignée cellulaire dérivée d'un carcinome colorectal humain de l'intestin

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator

Cl : Chlore

DMSO: Diméthylsulfoxyde

dNTP: désoxynucléotide triphosphate

DSS: Dextran sulfate sodium

EMEM: Eagle's minimal essential medium

ENaC: Epithelial sodium channel

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

FK: Fibrose kystique

HRP: Horseradish Peroxidase

IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine

IL: Interleukine

IL-1 β : Interleukine-1 beta

IL-8: Interleukine 8

I κ B: Inhibitor of kappa B

I κ K: Inhibitor of κ B kinase

JNK: Jun N-terminal kinase

LPS: Lipopolysaccharide

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MKP-1: Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1

MTT: Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium
NBD: Nucleotide Binding Domains
NFκB: Nuclear Factor kappa B
NOD: Nucleotides Oligomerisation Domain
PAMP: Pathogen Associated Molecular Patterns
PBS: Phosphate Buffered Saline
pH: Potentiel Hydrogène
PRR: Pattern Recognition Receptors
PTH: Parathormone
RXR: Retinoid X receptor
Scr: Scrambled
TLR: Toll-Like Receptor
TMD: Domaine hydrophobe transmembranaire
TNF-α: Tumor Necrosis Factor alpha
VDRE: Vitamin D response element
VDR: Vitamin D receptor
ZO-1: Zonula Occludens
1,25(OH)₂D: 1,25-dihydroxyvitamine D
25OHD: 25-hydroxyvitamine D
966FK: Cellule Caco-2/15 dont le CFTR a été invalidé génétiquement
ΔF508: Délétion d'un résidu phénylalanine en position 508 de la chaîne protéique

*«Si tu veux aller vite, vas-y seul;
Mais si tu veux aller loin, vas-y avec les autres»*
-Proverbe africain

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent d'abord à ma directrice de recherche, Geneviève Mailhot.

Merci de m'avoir fait confiance en m'accueillant dans l'équipe, d'avoir su me diriger sur de bonnes pistes dans la réalisation de mon projet de recherche. Pour tout, je demeure très reconnaissante.

Avec autant de sincérité, je remercie vivement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire. Votre participation à ce grand moment important de ma vie est un honneur pour moi.

Je tiens à dire un Gros merci à l'assistante de recherche, Geneviève Morin, d'avoir été un bon mentor tout au long de mon parcours.

Merci à Valérie Orlando ma collègue de travail et une amie extraordinaire qui a su mettre de la joie et des sourires dans le laboratoire.

Pour sa patience et son aide peu importe le moment de la journée, ainsi que sa grande motivation contagieuse envers moi je voulais te dire Merci Alain Sané.

De plus, merci à tout le personnel du 5^{ième} étage du Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine qui m'a aidé de près ou de loin dans l'évolution de mon projet de maîtrise.

Un énorme MERCI à mon père, ma mère ainsi que mes sœurs, Joanie et Marie-Pier, de votre soutien et vos encouragements remplis d'amour même si la distance nous sépare vous êtes toujours avec moi.

Merci Jacques d'être le plus beau et merveilleux chat réconfortant.

Sans oublier, je remercie mes précieuses petites cellules qui ont sacrifié leurs vies pour l'avancée de la science.

INTRODUCTION

"Fibrose kystique je t'en supplie sors de moi, laisse-moi vivre!"

À la base tu es juste un problème. Oui un problème parmi tant d'autres. À la base tu es juste lié à des mutations du gène CFTR sur le chromosome 7. Avec ça on va aller loin! Un simple chromosome peut avoir tant d'impact sur votre vie? Une chose si minuscule peut changer le restant de votre vie? Apparemment oui, c'est désolant mais c'est ainsi.

Des rêves plus ou moins importants. Moi, j'en ai un seul, il n'a pas l'air si dur que ça à réaliser. Mais pourtant, en plus de 15 ans toujours rien. Les heures... Les jours... Les mois... Les années passent, et toujours rien... On nous dit souvent "Garde espoir!"

"La recherche avance"? Oui elle avance ça c'est sûr, mais il faudra encore de longues années pour qu'un médicament "miracle" soit là. Parce que les chercheurs sont loin d'être des magiciens. Les recherches avancent mais malheureusement pas assez vite.

Il faut des années et des années, pour enfin trouver ce remède miracle, celui qui sauvera tant de vies! "

Message d'une adolescente atteinte de la fibrose kystique

Tiré du site web; <http://marion-contre-la-muco.skyrock.com>

Ce cri du coeur est un parmi des milliers de personnes souffrant de fibrose kystique (FK). C'est dans la recherche que se situe leur seul espoir; la découverte d'un traitement curatif contre la FK. Voilà 25 ans que ce gène fût découvert et pourtant aucun traitement n'a été découvert pour guérir complètement cette maladie. Malgré tout, la prise en charge des malades progresse, améliorant de plus en plus leur qualité et leur espérance de vie. Ainsi l'espérance de vie qui était de 10 ans en 1970 est désormais de 49,7 ans (1). De ce fait, les personnes atteintes de FK peuvent vivre aujourd'hui presque comme toute personne en santé; étudier, avoir un emploi et fonder une famille. La recherche médicale se mobilise pour offrir une vie normale à ces personnes. Cependant, la FK reste encore une maladie mortelle et très imprévisible.

CHAPITRE 1. Recension des écrits

1.1 L'intestin

1.1.1 Anatomie et histologie intestinale

1.1.1.1 Anatomie

Lieu d'absorption du bol alimentaire, l'intestin grêle est un organe creux sous forme d'un tube ayant un diamètre de 4 cm et une longueur qui varie de 4 à 5m. Il est rattaché d'une extrémité à l'autre par l'estomac et le gros intestin. Il se divise en 3 segments (**Figure 1**) :

a) Le duodénum

Le duodénum fait suite à l'estomac, au niveau de la partie distale de l'anse gastrique, en débutant au pylore pour finir à l'angle duodénojéjunal de Treitz. Organe fixe et accolé au péritoine postérieur, le duodénum se différencie des deux autres portions de l'intestin grêle par sa proximité envers le pancréas et ses rapports avec l'axe biliaire via le canal cholédoque (2).

Les cellules tapissant la paroi du duodénum constitue une muqueuse faite de villosités, distincte du reste de l'intestin grêle, et dont la sous-muqueuse renferme les glandes de Brünner qui sont typiques au duodénum.

b) Le jéjunum

Le jéjunum se situe entre le duodénum et l'iléon et constitue la partie centrale de l'intestin grêle avec une longueur d'environ 2,4 m et un diamètre approximatif de 2 à 4cm.

c) L'iléon

Dernière partie de l'intestin grêle qui mesure environ 3,6 m de long et se fixe au gros intestin. L'iléon est précédé du jéjunum et se termine par le cæcum au niveau de la jonction iléo-cæcale où se situe un sphincter empêchant le reflux du contenu du colon.

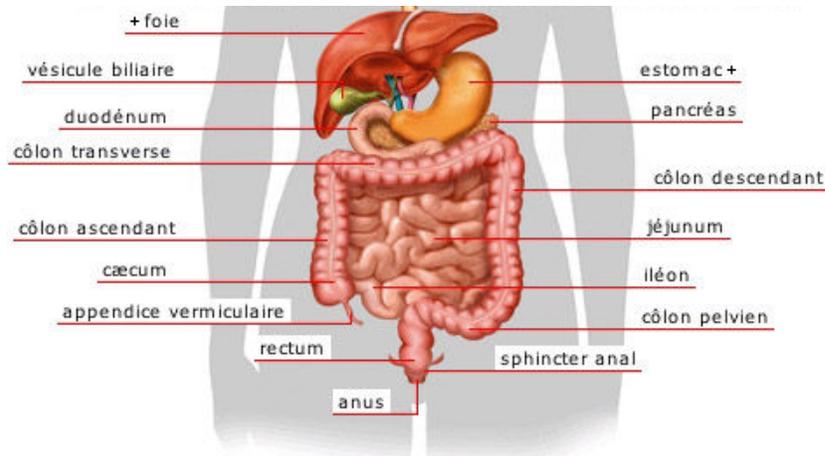


Figure 1 : Système digestif

Tirée de (3)

1.1.1.2 Histologie

1.1.1.2.1 La paroi intestinale

Quatre couches forment la paroi intestinale de l'intestin grêle (**Figure 2**) :

- a) **La séreuse**, encore appelée séreuse péritonéale, constitue la couche mince extérieure recouvrant l'intestin grêle. La séreuse est fixée au mésentère et est formée par les cellules de la couche viscérale du péritoine, d'où l'autre appellation de feuillet viscéral du péritoine.
- b) **La musculuse** ou *muscularis propria*, comme son nom l'indique, est constituée par des cellules musculaires lisses longitudinales et circulaires qui jouent un rôle important dans le péristaltisme intestinal.
- c) **La sous-muqueuse** ou la conjonctivo-vasculaire se situe sous la muqueuse. Elle est constituée de tissu conjonctif, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de nombreuses fibres élastiques et d'un réseau de neurones appelé le plexus sous-muqueux. C'est au niveau de la sous-muqueuse que se localisent les glandes de Brünner dont la sécrétion de mucine alcaline est responsable de la neutralisation du suc gastrique. De plus, les glandes de Brünner sont à l'origine de la sécrétion de l'*epidermal growth factor* (EGF) qui est un facteur de croissance aux actions trophiques, notamment dans les mécanismes de réparation lors d'agressions de la muqueuse.

d) La **muqueuse** est la couche qui est composée de cellules épithéliales et du tissu conjonctif nommé lamina propria (**Figure 3**). Elle a comme rôle d'augmenter l'absorption des nutriments et ce, grâce à la présence de valvules conniventes recouvertes de villosités intestinales, elles-mêmes faites de microvillosités. Son quart inférieur est appelé crypte de Lieberkühn, qui s'ouvre à la base des villosités intestinales et aide au renouvellement de l'épithélium. Chaque villosité intestinale contient un vaisseau lymphatique ainsi qu'un réseau sanguin qui se compose d'artérioles subdivisées en capillaires. Ces capillaires sont ensuite drainés vers les veinules descendantes des villosités (4).

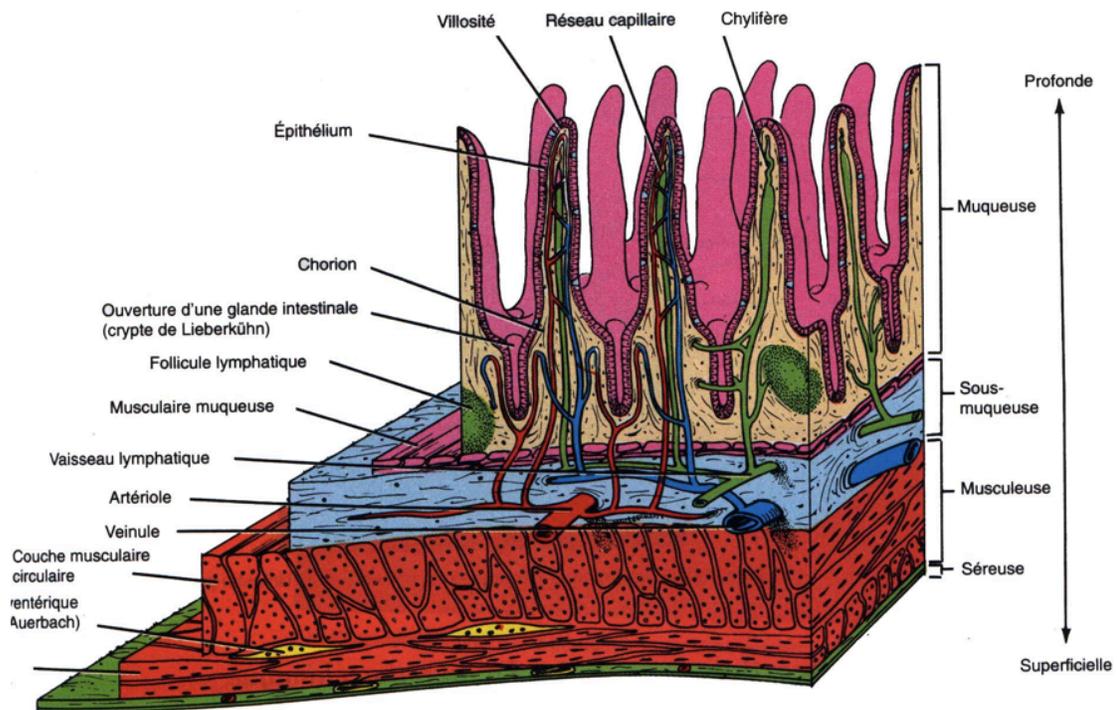


Figure 2 : Structure de la paroi intestinale

Tirée de (5)

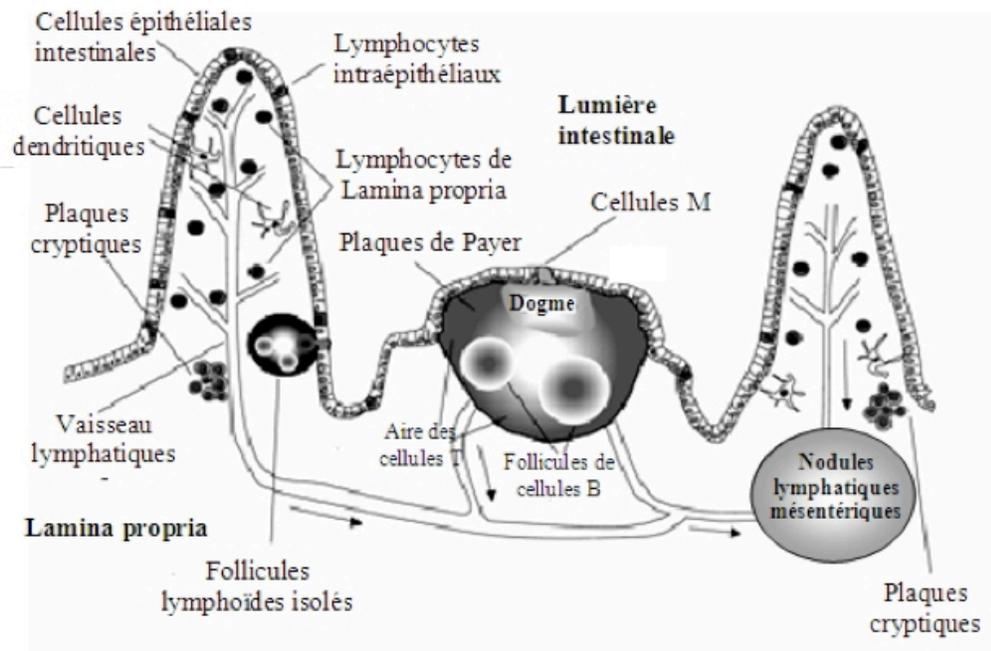


Figure 3 : Structure de la muqueuse intestinale

Adaptée de Spahn *et al.* 2004 (6)

Les entérocytes qui proviennent de la division asymétrique des cellules somatiques représentent 80% des cellules intestinales. Les plus internes de l'intestin grêle sont en contact direct avec le chyme afin d'assurer l'absorption intestinale. Les entérocytes prennent naissance dans les cryptes, puis migrent vers le sommet de la villosité tout en se différenciant (**Figure 4**). De forme cylindrique, le pôle apical des entérocytes est constitué de stries de microvillosités. Chaque microvillosité renferme un complexe filamenteux axial appelé "*terminal web*" qui lui confère des propriétés contractiles grâce à la présence d'actine et de myosine. Diverses enzymes hydrolytiques soit des peptidases, aminopeptidases, disaccharidases, ainsi que les phosphatases alcalines se retrouvent au niveau du plateau strié des entérocytes. Les entérocytes sont également riches en réticulum endoplasmique lisse qui assure l'absorption des lipides (7).

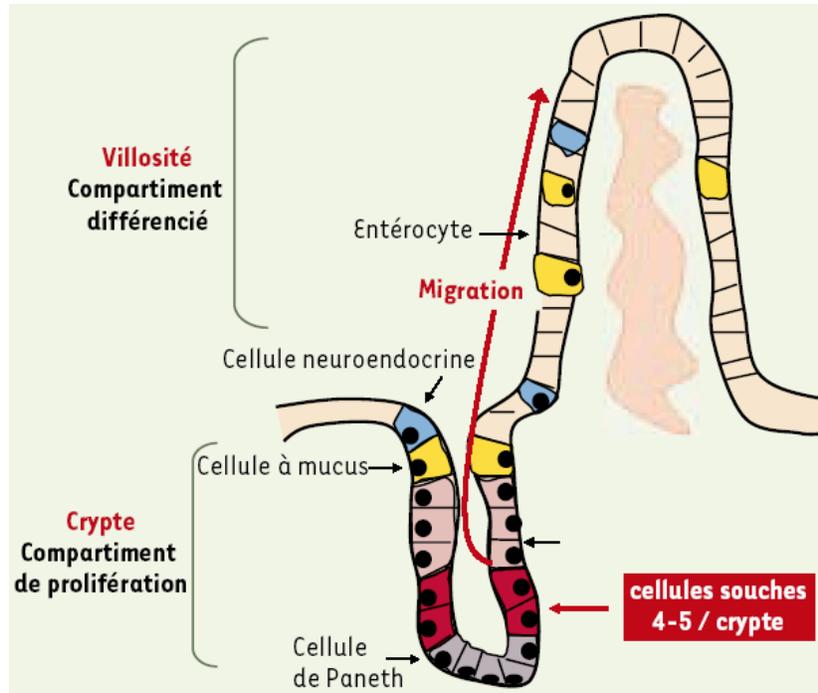


Figure 4 : Organisation des cellules de l'intestin grêle

Tirée de Andreu *et al.* 2006 (8)

1.1.2 Physiologie

1.1.2.1. Absorption

Le rôle physiologique principal de l'intestin grêle consiste en l'absorption des nutriments. Le duodénum joue un rôle sécrétoire important qui assure notamment la neutralisation de l'acidité gastrique, la libération d'enzymes digestives et de bile et le mélange de ces derniers avec le bol alimentaire. C'est au niveau du jéjunum que s'effectue la plus grande partie de la digestion et l'absorption des glucides, des protéines et des lipides de même que celle de l'eau et des électrolytes. L'iléon a pour rôle l'absorption de nutriments plus spécifiques tels que la vitamine B12 mais aussi des sels biliaries.

1.1.2.2 Défense immunitaire

Il existe un équilibre entre les mécanismes de défense immunitaire et les bactéries; les bactéries jugées inoffensives ne sont pas éliminées par le système immunitaire et ce, par un système de régulation. Si cette régulation est altérée, ceci provoquera une activité immunitaire

excessive et il en résultera une inflammation anormale du tube digestif, à l'origine de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique ou la colite ulcéreuse.

Il existe différents types de flore intestinale qui se caractérisent par leur composition bactérienne. La flore dominante est exclusivement anaérobie et est constituée de concentrations élevées de bactéries ($\geq 10^9$ UFC¹) de type bacteroides et bifidobactéries. La flore sous-dominante (10^6 à 10^8 UFC) comporte des bactéries aéro-anaérobiques facultatives de type entérobactéries, streptocoques et lactobacilles. Puis, la flore de passage comporte des bactéries potentiellement pathogènes dont le développement est inhibé par la flore endogène. Comme son nom l'indique, la flore de passage ne se fixe pas dans le tube digestif.

Les entérocytes forment également des jonctions serrées permettant ainsi de bloquer les agents pathogènes (9). Ils sécrètent des protéines anti-microbiennes dont les défensines, les cathélicidines et les lectines de type C.

Les entérocytes produisent un gel formé de mucines, qui sert à la fois de barrière aux bactéries et de réservoir de peptides anti-microbiens en plus de contenir des immunoglobulines A. Les entérocytes également présentateurs d'antigènes non spécialisés, contrôlent la réponse immunitaire. Pour percevoir le contenu de la lumière intestinale et reconnaître les bactéries, on retrouve à la surface des entérocytes des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (ex: récepteurs *Toll-like* (TLR)). L'activation de ces récepteurs induit la sécrétion des cytokines ou chimiokines, agissant sur les cellules immunitaires présentes dans la lamina propria. En sécrétant des chimiokines, dont l'interleukine-8 (IL-8), les entérocytes sont responsables de l'induction précoce des réponses inflammatoires nécessaires au chimiotactisme ou encore à l'activation des cellules immunitaires avoisinantes (10, 11).

¹ UFC/g: Unités Formant Colonies/ gramme de fèces

1.1.2.2.1 La réponse immunitaire et inflammatoire

Le système immunitaire comporte deux types de réponse: innée et acquise. Les bactéries qui résistent aux protéines intraluminales ayant des propriétés antibactériennes et à la couche de mucine, peuvent atteindre les cellules épithéliales intestinales (12). Le relais sera assuré par des molécules du non-soi nommées *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMP) qui seront reconnues par les *Pattern Recognition Receptors* (PRR), des récepteurs du soi localisés à la surface des cellules épithéliales. L'interaction entre les PAMP et les PRR provoque des réponses immunitaires innées et acquises pour éliminer les agents pathogènes et ainsi préserver la microflore intestinale (13).

A) La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée est non-spécifique et constitue la première défense face à une infection. Elle mobilise plusieurs types de mécanismes incluant les barrières physiques que constituent la muqueuse intestinale et l'inflammation qui représente une ligne de défense naturelle contre les agents infectieux ayant réussi à traverser le revêtement cutanéomuqueux. Les PRR les plus connus demeurent les TLR, des récepteurs membranaires qui reconnaissent les PAMP (14, 15). L'inflammation débute par une dilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire suivis par le chimiotactisme puis l'activation des cellules polynucléaires neutrophiles et basophiles, et des mastocytes. Les monocytes/macrophages, eux, sont activés en phase plus tardive d'inflammation. L'activation des cellules immunitaires conduit notamment à la sécrétion de peptides anti-microbiens, de cytokines et de chimiokines (14). Ces molécules peuvent à leur tour agir sur les entérocytes, ce qui permet de maintenir voire même d'amplifier la réponse immunitaire mucosale.

B) La réponse immunitaire acquise

Les lymphocytes sont les cellules responsables de la réponse immunitaire acquise. Il en existe deux types : 1) les lymphocytes B ou immunoglobulines responsables de l'immunité humorale et de la production d'anticorps qui vont agir de manière spécifique sur l'agent infectieux rencontré et 2) les lymphocytes T responsables de l'immunité cellulaire qui sont issus du thymus et peuvent détruire directement les antigènes. Les lymphocytes composent le tissu lymphoïde associé au tube digestif appelé *Gut-Associated Lymphoid Tissue* (GALT) et se

retrouvent dans les plaques de Peyer, les ganglions mésentériques et peuvent même migrer dans la lamina propria et se retrouver dans l'épithélium (lymphocytes intra-épithéliaux) (16, 17) (**Figure 5**).

À la suite de l'activation du système immunitaire inné, les bactéries symbiotiques fournissent des signaux pour activer le développement de sous-ensembles de lymphocytes appropriés (9). De plus, les TLR (TLR1 à 11) ainsi que les *Nucleotides Oligomerisation Domain* (NOD1 et NOD2) vont participer à la régulation des réponses immunitaires acquises.

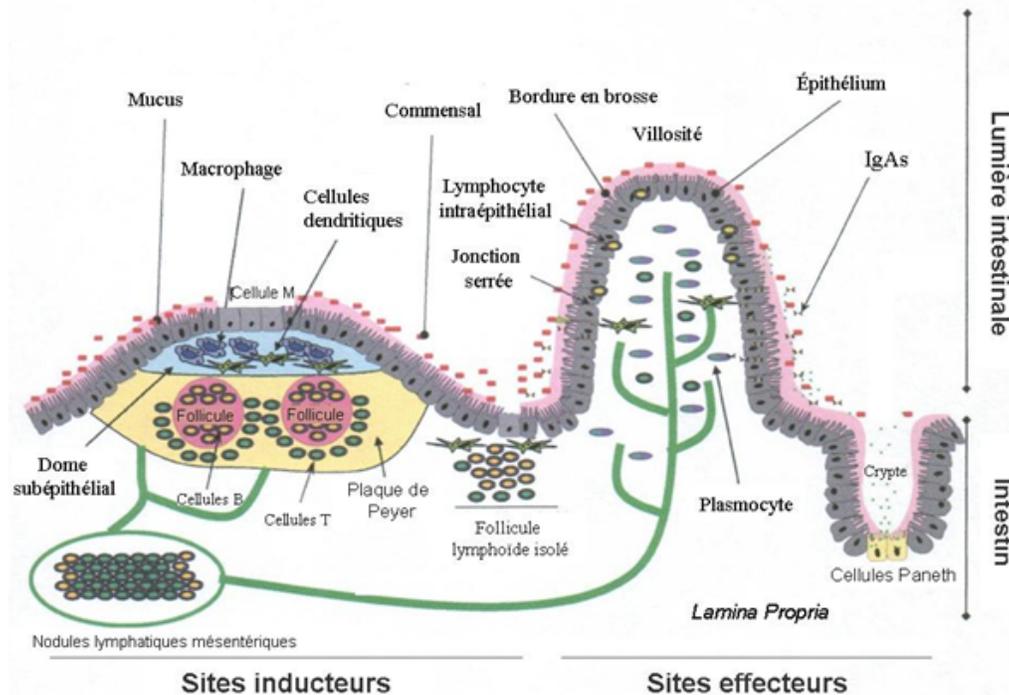


Figure 5 : Le système immunitaire intestinal

Adaptée de Magalhaes *et al.* 2007 (18)

1.2 LE CFTR

1.2.1 Structure

1.2.1.1 Le gène

Le gène *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) identifié en 1989 (19, 20) code pour la protéine CFTR membranaire responsable notamment de l'efflux d'ions chlorure, de bicarbonate et de thiocyanate (21). Ce gène se trouve sur le locus 7q31.2, dans la région q31.2 du bras long du chromosome humain 7 et comporte 27 exons qui s'étalent sur 250 kilobases.

1.2.1.2 La protéine

Le CFTR est une glycoprotéine qui fait partie de la famille des transporteurs *ATP Binding Cassette* (ABC) (22). Faisant partie des protéines ubiquitaires, les transporteurs ABC ont comme rôle de transporter à travers la membrane et ce, grâce à la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, diverses molécules telles que des protéines, des lipides, des sucres, des ions, des antibiotiques ou des drogues (23, 24).

La protéine CFTR est constituée de 1480 acides aminés et contient une répétition de deux motifs reliés par un domaine cytoplasmique (domaine R) ayant chacun un domaine hydrophobe transmembranaire (TMD) qui comporte six hélices et une région hydrophile avec des séquences de liaison et d'hydrolyse de l'ATP appelées *Nucleotide Binding Domains* (NBD) (**Figure 6**).

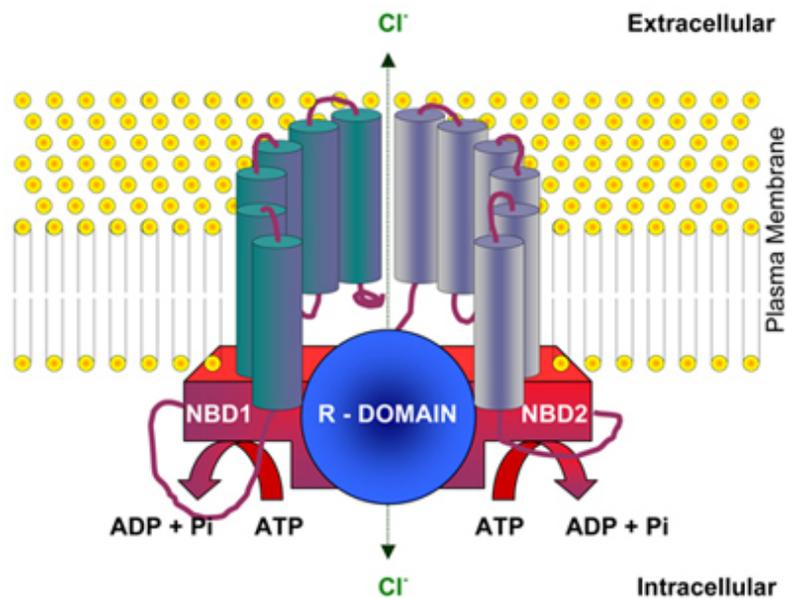


Figure 6 : Structure du CFTR

Tirée de (25)

1.2.2 Expression du CFTR

La transcription du gène du CFTR ne s'effectue pas que dans les cellules épithéliales, mais aussi dans les cellules non-épithéliales. Le gène du CFTR a été mis en évidence essentiellement au niveau du poumon, de l'intestin, du pancréas, des glandes salivaires, de la

vésicule biliaire, des glandes sudoripares et du tractus génital. L'expression du CFTR semble prédominante dans les glandes sous-mucosales du poumon (26) , mais est également présente tout au long du tractus intestinal. Un gradient d'expression génique décroissant est constaté de la crypte vers la villosité de même que de la partie proximale à la partie distale de l'iléon. Malgré ce gradient, le niveau d'expression protéique demeure élevé à la surface des entérocytes (27). L'expression du CFTR a également été démontrée dans les ostéoblastes et les macrophages, deux types cellulaires non-épithéliaux (19,20). Le rôle du CFTR au sein des tissus non-épithéliaux reste cependant à être clarifié.

1.2.3 Rôles du CFTR

a) Canal Chlorure (Cl⁻) et régulation du fonctionnement des autres canaux ioniques:

La protéine CFTR a comme rôle principal de faire sortir les ions chlorures de la cellule épithéliale. Le changement de la conformation de la protéine est activé par la fixation de l'ATP et subséquemment s'effectue l'ouverture du canal. Une deuxième fixation d'ATP semble prolonger le temps d'ouverture du canal dont la fermeture est conditionnée par l'hydrolyse de l'ATP en ADP (24, 28, 29). La protéine CFTR semble contrôler également le fonctionnement des autres canaux ioniques de la cellule épithéliale soit le canal Na⁺ (ENaC) (30), les *canaux chlores* (ClC) (31) et *Outwardly Rectifying Chloride Channel* (ORCC) (32) ainsi que les canaux potassiques *Inwardly rectifying ATP-sensitive renal potassium channel* (ROMK) (33).

b) Protéine multifonctionnelle:

Indépendamment de son rôle de canal ionique, des fonctions dans le transport d'ATP, la modulation des phénomènes d'exocytose et endocytose, de même que la régulation du pH des organelles intracellulaires ont été documentées (34). De plus, le canal CFTR permet également le déplacement transmembranaire du glutathion, à la surface apicale des cellules épithéliales. Le présence du CFTR augmente la sécrétion de bicarbonate et éventuellement celle du glutathion dans le liquide de la surface épithéliale (35). Ainsi, l'absence ou le dysfonctionnement du CFTR cause une déshydratation, une acidification et une diminution de la concentration de glutathion et de bicarbonate du liquide extracellulaire. La déshydratation a pour conséquence d'accroître la viscosité du mucus, causant subséquemment son

accumulation et l'obstruction des voies respiratoires et digestives.

Il a été documenté que le CFTR agit comme un « hub » en interagissant physiquement avec plusieurs protéines incluant des kinases dont l'adénosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), des phosphodiesterases, des éléments du cytosquelette et des récepteurs (36). Il est d'ailleurs suggéré que ce « hub » agit comme un rhéostat qui permet à la cellule de réagir aux agressions externes. En cas de dysfonction du CFTR, ce complexe est altéré causant des réponses cellulaires inappropriées. Cette théorie pourrait d'ailleurs expliquer pourquoi une cellule dont le CFTR est absent ou dysfonctionnel, qu'elle provienne des voies aériennes ou qu'elle soit de nature immunitaire, exhibe des réponses inflammatoires exagérées (37). Ce projet permettra de confirmer ou non si la cellule intestinale peut être ajoutée à la liste des cellules présentant un phénotype hyperinflammatoire lorsque le CFTR est absent ou dysfonctionnel.

Le fonctionnement du CFTR dans le système gastro-intestinal est primordial puisqu'il permet la sécrétion des fluides et du bicarbonate notamment par l'intestin, le pancréas et le foie. Le bicarbonate permet de neutraliser l'acidité venant de l'estomac. Cette neutralisation est nécessaire puisque la majorité des enzymes intestinales et pancréatiques sont inactives en milieu acide. Un obstacle à la libération et/ou l'activité des enzymes pancréatiques entraîne une mauvaise digestion et la malabsorption des nutriments liposolubles. De plus, cette neutralisation assure également une meilleure solubilité des sels biliaires. Les cryptes exprimant un haut niveau de CFTR sécrètent un volume important de fluides afin de garder un environnement stérile pour la protection des cellules de Paneth (38).

1.3 La fibrose kystique

1.3.1 Définition de la maladie et prévalence

La FK est une maladie génétique et héréditaire des cellules épithéliales bordant les différents organes comme les voies respiratoires, le tube digestif, le système reproducteur, l'intestin et les glandes sudoripares. La FK survient suite à des mutations du gène CFTR qui mènent à l'absence complète de la protéine CFTR ou encore à une protéine dont la structure ou la fonction est altérée. Selon Fibrose kystique Canada, la FK touche un enfant sur 3 600 nés au

Canada. Environ 4 000 enfants, adolescents et adultes canadiens sont atteints de cette maladie génétique (1).

1.3.2 Étiologie

1.3.2.1 Les mutations du gène CFTR

Actuellement, plus de 2000 mutations du gène CFTR, en cause dans la FK, ont été identifiées. Ces mutations ont été réparties en 6 grandes classes selon le degré d'atteinte du CFTR (39, 40). Les mutations des classes I et II sont caractérisées par l'absence de CFTR membranaire et sont associées au phénotype le plus sévère de la FK. Ces mutations empêchent la synthèse protéique du CFTR (classe I) ou encore entraîne sa conformation anormale (classe II). La mutation la plus fréquente est la mutation Delta F508 ($\Delta F508$). Responsable de 70 % des cas de FK, la mutation $\Delta F508$ consiste en la délétion de trois nucléotides (41). Cette délétion entraîne l'élimination du résidu phénylalanine en position 508 ($\Delta F508$) (42). L'absence du résidu phénylalanine altère la conformation de la protéine qui est rapidement éliminée par le système protéasomal et très peu adressée à la membrane apicale. Le peu de CFTR qui atteint la membrane est instable et non-fonctionnel. À l'inverse, les mutations des classes III, IV, V et VI sont caractérisées par la présence du CFTR membranaire et sont responsables d'un phénotype variant de sévère à léger. Le CFTR présente des défauts dans sa régulation (classe III) ou sa fonction (classe IV) ou encore se retrouve en quantité sous-optimale (classe V) ou se renouvelle (*turnover*) trop rapidement à la membrane (classe VI).

1.3.3 Symptômes

1.3.3.1 Généralités

La FK est une maladie qui comporte plusieurs symptômes qui varient de légers à graves. Les personnes atteintes de la FK présentent des symptômes surtout d'ordre pulmonaire et gastro-intestinal tels que la difficulté à respirer, une toux avec expulsion de mucus épais, de la difficulté à prendre du poids mais une facilité à le perdre, des troubles intestinaux multiples, des infections pulmonaires à répétition et un retard de croissance. En outre, les hommes sont stériles due à l'obstruction du canal déférent. De plus, les patients FK souffrent d'une

malabsorption intestinale qui provoque une mauvaise absorption des vitamines liposolubles (A, D, E et K) pouvant conduire à l'acrodermatite, la neuropathie, la cécité nocturne, l'anémie, l'ostéoporose, ainsi que des troubles liés à la coagulation (40, 43).

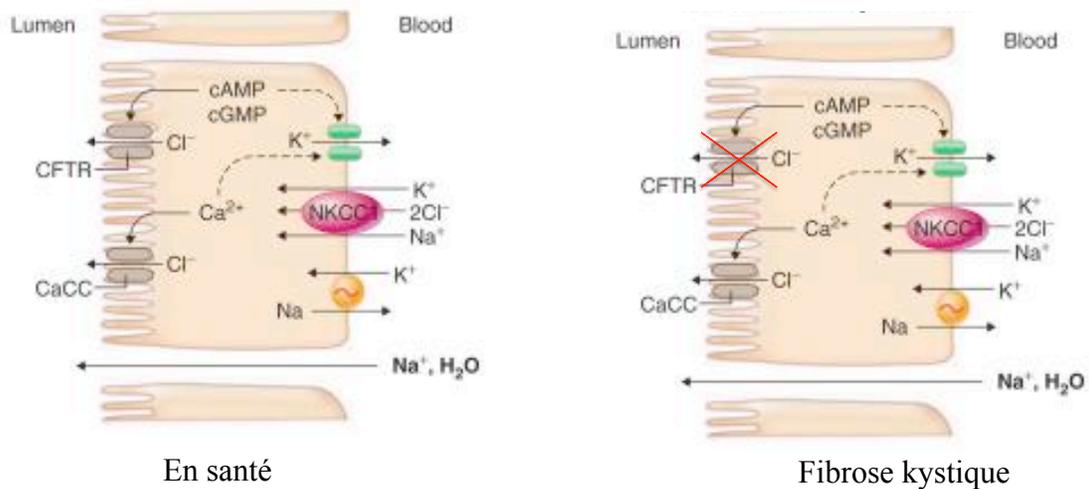


Figure 7 : Mécanisme de sécrétion du chlore par les cellules des cryptes intestinales.

Adaptée de (44)

1.3.3.2 Manifestations gastro-intestinales : Physiopathologie

a) Pancréas

Environ 85-90 % des patients atteints de mutations sévères du CFTR naissent avec une insuffisance pancréatique exocrine (38). Le CFTR étant présent sur la surface apicale des cellules ductulaires du pancréas exocrine, son absence cause une diminution importante de la sécrétion de chlore, d'eau et de bicarbonate dans les canaux pancréatiques. Ceci a pour conséquence une déshydratation marquée des sécrétions pancréatiques, une diminution du pH intra-ductulaire et une obstruction des canaux pancréatiques empêchant le déversement des enzymes digestives (45). En conséquence, les lipides, les protéines, les vitamines et les minéraux contenus dans le bol alimentaire ne sont pas bien digérés ni absorbés. Des carences nutritionnelles et une dénutrition s'observent alors chez le malade en plus de diarrhées abondantes et nauséabondes résultant de la stéatorrhée. En outre, le pancréas sera attaqué par les protéases, activées prématurément par l'abaissement du pH intra-ductulaire.

b) Intestin grêle

Les manifestations intestinales surviennent dès la période néonatale avec un iléus méconial chez 15% des enfants porteurs de la maladie (40). L'expression du CFTR dans l'intestin augmente la sécrétion de bicarbonate qui permet de neutraliser l'acidité du chyme issu de l'estomac. Cette neutralisation permet l'activité des enzymes pancréatiques et la solubilité des sels biliaires. De plus, l'activation du CFTR se fait grâce à la présence d'ions Cl^- venant du sang par le cotransporteur NKCC1 situé dans la membrane basolatérale et cette activation du CFTR présent dans les cryptes permet aux ions de chlore de se diriger vers la lumière intestinale par l'intermédiaire des médiateurs intracellulaire tels que l'AMPc et GMPc ou Ca^{2+} pour permettre aussi d'activer le canal CaCC afin de laisser sortir le Cl^- au niveau apical. Par contre, en situation pathologique, le CFTR est muté et la sécrétion de chlore est réduite, engendrant une augmentation de la viscosité du mucus et son accumulation dans les voies digestives (**figure 7**).

La perte du CFTR au niveau intestinal provoque aussi une diminution du bicarbonate, un environnement relativement déshydraté ainsi qu'une augmentation de l'acidité qui entraînent une maldigestion et une obstruction. Effectivement, l'expulsion du méconium est inhibé par la présence de mucus et provoque une occlusion intestinale à l'origine de l'iléus méconial. L'obstruction intestinale peut également survenir chez l'adulte FK et se nomme le syndrome de l'occlusion distale de l'intestin (46). Si non-traitée ce syndrome peut entraîner une rupture de la barrière épithéliale de l'intestin et provoquer une perturbation de la motilité intestinale et une grave inflammation avec altération des réponses immunitaires innées (27, 47). La perte du CFTR au niveau des entérocytes peut également entraîner une augmentation de la perméabilité intestinale causée par une rupture des jonctions serrées (48). En effet, l'une des protéines des jonctions serrées, la *zonula occludens* (ZO-1), possède un domaine de liaison (PDZ) avec lequel interagit la portion C-terminale du CFTR (49).

c) Foie

Dans le foie, la présence du CFTR dans l'épithélium des voies biliaires augmente la sécrétion de chlore dans la bile (50). L'absence d'un CFTR fonctionnel à la surface des cellules épithéliales des canaux biliaires diminue la fluidité de la bile et son alcalinité, provoquant ainsi

l'accumulation et la précipitation des sécrétions biliaires (51) Les sécrétions de mucus conduisent à une hyperprolifération, une inflammation et une obstruction intra-canaliculaire des conduits biliaires. L'hypersécrétion de mucus obstrue les canaux responsables de la circulation de la bile, nécessaire à la digestion des lipides. Non digérés, les lipides ne seront donc pas absorbés et vont provoquer des stéatorrhées. La maladie hépatobiliaire touche environ 33% des patients atteints de FK (51). Toutefois, les patients FK sans maladie hépatique présentent une perte fécale accrue de sels biliaires et forment peu de micelles, ce qui contribue à la malabsorption des graisses et des vitamines.

1.3.4 Autres manifestations gastro-intestinales

1.3.4.1 Dysbiose du microbiote intestinal

Chez une personne en santé, le tractus gastro-intestinal est composé de milliards de bactéries principalement situées dans le caecum et le côlon. Il a été récemment démontré que le microbiote des patients atteints de FK est perturbé par une augmentation des bactéries pathogéniques dû à plusieurs mécanismes défailants dont entre autres le pH gastrique, le péristaltisme, les processus antibactériens intestinaux ainsi qu'un défaut au niveau de la valve iléo-caecale qui permet de contrôler la quantité de bactéries dans l'intestin grêle (47). Une perturbation de l'un de ces mécanismes peut entraîner une pullulation bactérienne dans l'intestin grêle ainsi qu'une malabsorption. Ce syndrome peut entraîner la diarrhée, la distension abdominale, des flatulences, une stéatorrhée, une anémie macrocytaire ainsi qu'une perte de poids (52). On retrouve également d'autres facteurs qui peuvent contribuer à la dysbiose microbienne chez les FK dont, entre autres, la prise quotidienne d'antibiotiques pour contrer les infections pulmonaires. Ces antibiotiques affectent le système gastro-intestinal en éliminant les bactéries commensales qui sont essentielles à l'équilibre de la flore intestinale.

1.3.4.2 L'Inflammation intestinale liée à la FK

L'inflammation intestinale persistante est également présente chez les patients FK. Cependant, l'étiologie de cette inflammation intestinale demeure méconnue. L'absence d'un CFTR fonctionnel semble être un facteur prédisposant puisque des signes d'inflammation sont

détectés au moment du diagnostic et en absence de toute lésion de la muqueuse intestinale. Plusieurs anomalies morphologiques sont observées dans le jéjunum et l'iléon chez environ 60 % des patients atteints de FK telles que l'œdème, l'érythème, des lésions de la muqueuse et des ulcérations. Des études ont notamment signalé des élévations importantes de calprotectine fécale, une protéine sécrétée principalement par les neutrophiles qui a été suggérée comme un biomarqueur d'inflammation de la muqueuse digestive (53). Ces observations cliniques sont corroborées par les études chez la souris *knockout* pour le CFTR chez qui on a rapporté une hausse de l'expression de plusieurs facteurs pro-inflammatoires dans le tissu intestinal ainsi qu'une quantité anormalement élevée de macrophages et de neutrophiles (54). De plus, ces souris ont développé spontanément une maladie inflammatoire intestinale (27).

Les conséquences d'un dysfonctionnement du CFTR observé dans l'intestin des patients souffrant de FK sont susceptibles d'être interreliés et d'entraîner une inflammation chronique ainsi qu'une perturbation de l'activité du système immunitaire inné. La perte de la fonction du CFTR, entraîne éventuellement une accumulation de mucus dans les cryptes de Lieberkühn et pourrait modifier les mécanismes de défense innée en bloquant l'accès aux sécrétions antibactériennes des cellules de Paneth. Il est également documenté que les molécules effectrices libérées par les mastocytes et polynucléaires neutrophiles tels que l'histamine, les protéases et les prostaglandines jouent un rôle important en stimulant la sécrétion de mucus. L'altération des réponses immunitaires intestinales peut également être déclenchée par une quantité excessive de mucus et une pullulation bactérienne de l'intestin grêle (27). De plus, la perte d'expression du CFTR cause une diminution de l'expression des facteurs de transcription qui induisent la prolifération des peroxyosomes (PPARs), qui sont des régulateurs du métabolisme des acides gras et de la réponse inflammatoire (55).

La protéine CFTR diminue le pouvoir transcriptionnel de NF κ B suggérant que le CFTR peut avoir un rôle de régulateur négatif sur la réponse inflammatoire (56). Lebowitz *et al.* 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 (57). Or, le CFTR est connu pour interagir

avec de nombreuses protéines dont le canal ENaC. L'activité du canal ENaC pourrait être régulée négativement par le CFTR (58). Donc, dans les cellules saines, l'inhibition qu'exercerait la protéine CFTR sur le canal ENaC, empêcherait l'activation de NFκB alors que dans les cellules CFTR-ΔF508, l'absence d'inhibition par le CFTR activerait ainsi le canal ENaC et NFκB.

1.4 Vitamine D

1.4.1 Métabolisme global

Il existe deux types de vitamine D : l'ergocalciférol, d'origine végétale et le cholécalciférol, d'origine animale. Les deux formes peuvent provenir de source exogène (alimentation/supplémentation) ou endogène (synthèse cutanée ou irradiation des végétaux). Lors de l'exposition solaire de la peau, le 7-déhydrocholestérol est transformé par les rayons UVB en prévitamine D₃ suivi par son isomérisation en cholécalciférol. Le cholécalciférol doit subir une double hydroxylation pour devenir bioactif. La première hydroxylation survient sur le carbone en position 25 au niveau du foie pour générer la forme circulante 25-hydroxyvitamine D (25OHD) ou calcidiol. Cette réaction est catalysée par l'enzyme 25-hydroxylase aussi connue comme étant le cytochrome P450 27A1 (CYP27A1). La seconde hydroxylation se fait au niveau rénal et consiste en l'ajout d'un groupe hydroxyl (-OH) au carbone en position 1 de la 25OHD pour synthétiser la 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25(OH)₂D) appelée calcitriol. L'enzyme responsable de cette deuxième hydroxylation est la 1-α hydroxylase ou cytochrome P450 27B1 (CYP27B1) (**Figure 8**). À noter que l'activité de CYP27B1 n'est pas restreinte aux reins puisque son expression a été détectée au niveau de plusieurs autres types cellulaires tels que les entérocytes, les kératinocytes, les ostéoblastes, les macrophages, les cellules de la prostate et les hépatocytes. La 1,25(OH)₂D peut donc être synthétisée ailleurs qu'au niveau du rein. Il est d'ailleurs rapporté que cette 1,25(OH)₂D exercerait plutôt une action locale de nature auto- ou paracrine et ne contribuerait pas au taux circulant. À l'inverse, la 1,25(OH)₂D rénale est libérée en circulation sanguine liée à sa protéine de liaison (la *D-binding protein*) et agit essentiellement de façon endocrine (59).

La régulation du métabolisme de la vitamine D se fait principalement au niveau de l'activité du CYP27B1. En effet, le ligand $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ diminue l'expression de la CYP27B1 rénale alors que la parathormone (PTH) la fait augmenter (60, 61) Le calcium sérique semble réguler la CYP27B1 indirectement via la PTH et directement par le récepteur à calcium (CaSR) (62). La calcitonine agit en faisant augmenter l'expression de l'enzyme (63) et finalement la phosphorémie la régule par le biais du FGF-23, une hormone qui inhibe l'activité du CYP27B1 (64).

À l'inverse, l'activité de la CYP27B1 extra-rénale serait régulée par des facteurs de communication intra ou intercellulaires tels les cytokines et les facteurs de croissance. La circulation adéquate de la 25OHD semble être un facteur important pour assurer la production périphérique optimale et l'action auto/paracrine de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, accentuant ainsi l'importance de maintenir une concentration suffisante de 25OHD. Il a d'ailleurs été maintes fois suggéré qu'une faible concentration sérique de 25OHD, et conséquemment une faible synthèse extra-rénale de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, est associée à la survenue de certaines maladies (65). Toutefois, certaines études ont démontré une augmentation de l'expression et de l'activité enzymatique de la CYP27B1 colonique dans plusieurs pathologies telles que les maladies inflammatoires de l'intestin. En effet, en présence d'inflammation intestinale, l'augmentation du nombre de cellules mononucléaires de la lamina propria combiné à la disponibilité de la $25(\text{OH})\text{D}$ augmente l'expression de la 1α -hydroxylase, ce qui permet de générer des niveaux plus élevés de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Il est suggéré que ce phénomène représente une réponse endogène visant à contrer l'inflammation (66). Il est donc possible que l'expression et l'activité de la CYP27B1 intestinale soient également perturbées chez les patients atteints de FK, puisque ces patients présentent une inflammation intestinale (53). Or, ceci n'a jamais été investigué.

Une autre enzyme clé influençant les concentrations cellulaires et circulantes de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ est la 24-hydroxylase ou cytochrome P450 24A1 (CYP24A1). La CYP24A1 hydroxyle le carbone en position 24 de la $25(\text{OH})\text{D}$ ou la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (67). L'expression de la CYP24 est particulièrement élevée dans le rein, mais la plupart des cellules cibles de la vitamine D l'expriment dont l'intestin. À l'état basal, l'activité de CYP24 est faible, voire inexistante,

mais elle est fortement induite par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (68). En effet, le promoteur du gène codant pour CYP24A1 possède deux éléments de réponse à la vitamine D, ce qui explique pourquoi la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ induit fortement ce gène (69). L'induction de CYP24A1 par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ est en fait un mécanisme de protection afin de prévenir des hausses intracellulaires de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ qui peuvent être cytotoxiques.

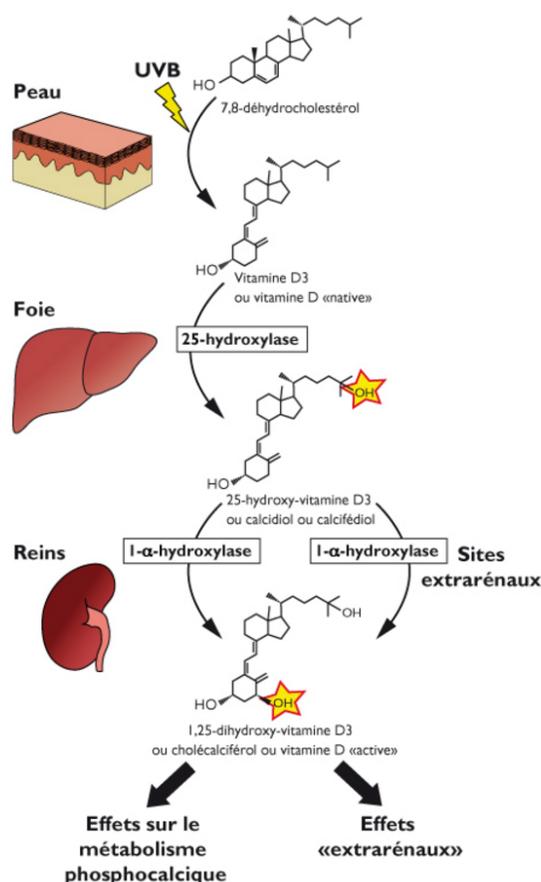


Figure 8 : Les grandes étapes de la biosynthèse de la vitamine D

Tirée de Hernandez *et al.* 2012 (70)

1.4.2 Rôles classiques de la vitamine D

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se lie au récepteur nucléaire de la vitamine D, appelé VDR. Le complexe $1,25(\text{OH})_2\text{D}/\text{VDR}$ interagit avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR) pour former un hétérodimère. Cet hétérodimère va se lier à des séquences d'ADN spécifiques, appelées

éléments de réponse à la vitamine D (VDRE; Vitamin D Response Element), localisées au niveau de régions promotrices et permettre ainsi l'expression ou la répression de plusieurs gènes. Les nombreux gènes régulés par la vitamine D sont impliqués dans de multiples fonctions biologiques dont entre autres, la régulation de l'homéostasie du calcium, la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation cellulaire, l'inflammation et l'immunomodulation (71).

Les fonctions de la vitamine D sont qualifiées de classiques et de non-classiques. Classiquement, la vitamine D est impliquée dans la régulation du métabolisme phosphocalcique et a ainsi une influence sur la santé osseuse. Hypercalcémiant, la vitamine D va ainsi maintenir une concentration phosphocalcique optimale pour la minéralisation osseuse en agissant sur l'intestin et en favorisant la réabsorption rénale de ces deux minéraux (72). Ces fonctions classiques sont attribuées à la 1,25(OH)₂D circulante.

1.4.3 Vitamine D et intestin

1.4.3.1 Métabolisme intestinal

Environ 75 % de la vitamine D est absorbé dans le jéjunum et l'iléon avant sa diffusion lymphatique pour rejoindre la circulation générale (73). L'intestin est un organe qui subit l'action endocrine et auto/paracrine de la vitamine D. Au niveau endocrine, il est largement reconnu que la 1,25(OH)₂D sérique pénètre dans l'entérocyte et exerce une action génomique qui se traduit par une augmentation de l'expression de plusieurs protéines impliquées dans l'absorption intestinale de calcium et de phosphore. Ainsi, la 1,25(OH)₂D augmente l'expression du *Epithelial calcium channel* (ECaC) et du *Plasma membrane Ca²⁺ ATPase* (PMCA1b), les deux protéines qui permettent respectivement l'entrée et la sortie du calcium des entérocytes. De plus, elle accroît l'expression de la calbindine 9K, une protéine de liaison du calcium cytoplasmique (74, 75). La 1,25(OH)₂D agit sur l'absorption intestinale du phosphore en augmentant l'expression de la pompe *type II sodium-dependent phosphate cotransporter* (NPT2b), un cotransporteur de sodium et de phosphore localisé sur la membrane apicale des entérocytes (76).

De plus, l'entérocyte possède la machinerie intracellulaire nécessaire à la bioconversion de la vitamine D en ses métabolites 25(OH)D et 1,25(OH)₂D (77). Malgré le fait que l'intestin peut être soumis à l'influence de doses pharmacologiques de vitamine D (via la supplémentation) pouvant venir activer les enzymes de bioconversion, cette voie de synthèse intra-intestinale est très peu caractérisée. Le système autocrine/paracrine intestinal de la vitamine D jouerait un rôle important dans le contrôle de l'immunité mucoale de même que celui de la croissance cellulaire en inhibant la prolifération et en stimulant la différenciation cellulaire (78, 79).

1.4.3.2 Rôles intra-intestinaux

La 1,25(OH)₂D synthétisée localement est plutôt associée aux rôles non-classiques de la vitamine D. Parmi ces fonctions non-classiques, on retrouve notamment ses actions immunomodulatrices et anti-inflammatoires au niveau de l'intestin et son effet sur la perméabilité intestinale.

1.4.3.2.1 Propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires

La vitamine D exerce un rôle important dans l'immunité innée, mais aussi dans l'immunité acquise. Au niveau de l'immunité innée, le VDRE est présent sur le promoteur de deux gènes codant pour des peptides antimicrobiens : CAMP (cathélicidine, LL-37) et DEFB2 et 4 (β-défensine-2 et-4). Des études *in vitro* effectuées sur différents types de cellules ont démontré que la 1,25(OH)₂D₃ stimule l'expression de la cathélicidine (80). Il a été suggéré que la vitamine D induit l'expression de la cathélicidine et de la β-défensine-4 dans des lignées cellulaires intestinales (81). Les défensines, elles, forment une ligne de défense contre les agents pathogènes et sont très importantes pour préserver la barrière antimicrobienne à la muqueuse intestinale.

Au niveau de l'immunité acquise, la vitamine D agit sur la prolifération, la différenciation et l'activation des cellules dendritiques et des lymphocytes B et T qui sont toutes des cellules se trouvant dans l'environnement gastro-intestinal. La 1,25(OH)₂D₃ permet notamment la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-10 et de la chimiokine CCL22. L'induction des T-helper (Th)1 et Th17 est inhibée par 1,25 (OH)₂D₃, ce qui favorise la réponse immunitaire des T régulateurs (Treg) et des Th2 (82-84).

La vitamine D joue également un rôle très important dans l'inflammation en agissant à plusieurs niveaux : sur les voies de signalisation des MAPK, sur la phosphatase MKP-1, sur le facteur de transcription NFκB et même sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles IL-8. Il a été démontré, dans des cellules épithéliales intestinales, que la 1,25(OH)₂D₃ inhibe la production IL-8 induite par le LPS en augmentant l'expression du CD14 soluble, une molécule qui neutraliserait le LPS (85). La vitamine D cible des voies de signalisation telles que p38MAPK et JNK en diminuant leur activation. De plus, elle réduit l'activation de NFκB dans les cellules épithéliales du côlon (86). La 1,25(OH)₂D réprime la signalisation de NFκB en augmentant la production de la protéine IκBα, ce qui permet d'atténuer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8, dans un modèle cellulaire d'adipocytes humains (87). En effet, la protéine cytosolique IκBα se lie au NFκB afin de l'empêcher de transloquer vers le noyau et activer la transcription de gènes pro-inflammatoires (88). La phosphatase MKP-1, dont le rôle est de déphosphoryler les MAPK et donc d'atténuer leur activation, possède un VDRE dans sa région promotrice. Ainsi, la vitamine D exerce une action anti-inflammatoire en augmentant l'expression de cette phosphatase (89). Ces observations ont par contre été faites au niveau des monocytes et des macrophages; ceci reste donc à prouver dans les cellules intestinales.

1.4.3.2.2 Perméabilité intestinale

Un autre élément important de la barrière intestinale est l'étanchéité et la stabilité de l'épithélium par la formation de différentes jonctions intercellulaires telles les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes (90-92). Cependant une modification dans la composition de ces jonctions peut augmenter la perméabilité de l'épithélium et ainsi permettre le passage paracellulaire des électrolytes et des macromolécules. Ces perturbations de la barrière sont présentes dans des pathologies telles que les maladies inflammatoires de l'intestin (93). L'inflammation de l'intestin entraîne une perméabilité paracellulaire accrue aux macromolécules et aux microorganismes (94), provoquant ainsi la libération de cytokines pro-inflammatoires par l'activation de voies de signalisation intracellulaire (95).

Le rôle de la vitamine D dans le maintien de la barrière intestinale et l'intégrité des jonctions serrées de la muqueuse intestinale a été démontré à l'aide de travaux réalisés sur la souris invalidée pour le récepteur de la vitamine D (VDR^{-/-}). En effet, lors d'administration d'une solution de dextran sulfate de sodium (DSS) utilisée pour provoquer une colite, les souris sauvages (wild-type) ont résisté au DSS tandis que les souris VDR^{-/-} ont développé une sévère diarrhée avec hémorragie rectale et perte de poids suivi de leur décès après seulement deux semaines (96). La 1,25(OH)₂D favoriserait l'expression de ZO-1, claudine-1 et -2 et E-cadhérine, des protéines des jonctions serrées qui assurent l'intégrité de la barrière intestinale (97). Or, les patients atteints de la FK souffrent également d'une augmentation de la perméabilité intestinale, causée par une anomalie des jonctions serrées (48). De Lisle *et al.* ont démontré l'augmentation de la perméabilité intestinale chez la souris CFTR^{-/-} (98). La ZO-1 est une protéine des jonctions serrées qui possède un domaine de liaison PDZ avec lequel interagit la portion C-terminale du CFTR. Comme la 1,25(OH)₂D favorise l'expression de ZO-1, ceci pourrait donc avoir un effet bénéfique sur la perméabilité intestinale accrue des patients FK.

1.4.4 Vitamine D et FK

La prévalence d'un statut insuffisant en vitamine D peut aller jusqu'à 90% chez diverses populations FK pédiatrique et adulte malgré le recours à une supplémentation massive et quotidienne (99-101). Une carence en vitamine D peut affecter le fonctionnement de plusieurs organes chez les FK. La vitamine D favorise l'absorption du calcium et du phosphore et joue un rôle important dans la minéralisation et le maintien de la masse osseuse. Or, l'ostéoporose est une co-morbidité qui se présente très précocement chez les FK (102). De plus, la vitamine D participe aussi au maintien de la force musculaire, défaillante chez les FK. Elle module le système immunitaire en stimulant la sécrétion de peptides bactéricides tels que la cathélicidine qui exerce son action sur le *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie qui infecte les voies respiratoires chez les FK. La production de la 1,25 (OH)₂D et son action dans les macrophages active les récepteurs des TLR pour augmenter l'expression de la cathélicidine afin de combattre les agents infectieux (103). Des études *in vitro* ont démontré, dans différents modèles cellulaires, que l'expression de cathélicidine est induite en présence de la 1,25(OH)₂D₃ dont entres autres, chez les cellules bronchiques avec la mutation ΔF508 (104).

Ces actions immunomodulatrices de la vitamine D pourraient également bénéficier à l'intestin FK, ce qui n'a pas encore été exploré. La vitamine D exerce également des propriétés anti-prolifératives, induit l'apoptose et stimule la différenciation cellulaire (105). La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ inhibe aussi la croissance cellulaire en diminuant l'expression de la cycline D1, une protéine impliquée dans la transition de la phase G1 à S (106). Ces fonctions permettent d'avoir un rôle chémoprotecteur contre le cancer du côlon dont la prévalence est particulièrement élevée chez les FK (107).

CHAPITRE 2. Problématique, Hypothèses et Objectifs

2.1 Problématique

Les patients FK souffrent de troubles digestifs qui incluent non seulement la malabsorption, mais également une inflammation intestinale modérée (27). Cette inflammation intestinale peut contribuer à accentuer la maldigestion, la malabsorption et les déficits nutritionnels déjà présents chez ces patients. Toutefois, l'étiologie de cette affection demeure à ce jour méconnue et les moyens visant à la prévenir et la contrôler ne sont pas définis.

Le rôle du CFTR a été largement étudié au niveau des poumons où sa dysfonction contribue notamment à l'augmentation de la viscosité du mucus et à son accumulation dans les voies respiratoires (108). Un CFTR dysfonctionnel conduit à une prolifération bactérienne exagérée favorisant l'apparition précoce d'infections. Ces infections deviennent rapidement chroniques et sont associées à des réactions inflammatoires exagérées (109). Le cercle vicieux infection/inflammation entraîne un remodelage, une dilatation permanente du diamètre des bronches (bronchiectasie), ainsi que des lésions épithéliales qui mènent ultimement à une insuffisance respiratoire majeure. Or, malgré ces évidences impliquant un rôle du CFTR dans le contrôle des réponses inflammatoires, aucune étude n'a exploré le rôle joué par ce canal ionique dans l'étiologie de l'inflammation intestinale associée à la FK. Ce travail entend combler ce manque de connaissances.

De plus, les personnes atteintes de FK présentent une malabsorption des lipides et des vitamines liposolubles, telle que la vitamine D. Ces patients sont au prise avec une insuffisance chronique en vitamine D malgré la prise d'une supplémentation massive (110). De plus, il a été démontré, dans un modèle de souris déficientes en vitamine D (carence nutritionnelle ou d'origine génétique), que celles-ci présentaient une inflammation intestinale plus sévère suite à l'administration d'un agent chimique inducteur d'inflammation (111). Or, de nombreuses études ont impliqué la vitamine D dans les maladies inflammatoires, puisque celle-ci possède des propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires (112). Il nous apparaît donc important d'explorer le potentiel anti-inflammatoire intestinal de la vitamine D

dans un contexte de FK dans le but d'identifier une approche thérapeutique peu coûteuse qui pourrait permettre d'atténuer l'inflammation intestinale dont souffrent ces patients.

2.2 Hypothèses et Objectifs

Suite à ces constats, nous avons émis les hypothèses suivantes :

- (1) La déplétion génique du CFTR et/ou l'inhibition pharmacologique de sa fonction au sein d'un modèle de cellules intestinales modifiera le profil inflammatoire de celles-ci.
- (2) Par ses propriétés anti-inflammatoires, la vitamine D viendra moduler à la baisse le profil inflammatoire de la cellule intestinale dont le CFTR aura été manipulé génétiquement et/ou pharmacologiquement.

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de cellules épithéliales intestinales humaines; les Caco-2/15. Ce modèle expérimental nous a permis de répondre aux objectifs suivants:

- 1) Investiguer le profil inflammatoire de cellules intestinales Caco 2/15 dont le CFTR aura été invalidé génétiquement et/ou inhibé pharmacologiquement par la mesure de l'expression génique et de la sécrétion d'une cytokine pro-inflammatoire (interleukine-8) de même que de l'activation de la voie de signalisation p38MAPK et du facteur de transcription NFκB.
- 2) Déterminer si l'ajout de la forme bioactive de la vitamine D permettra de moduler le profil inflammatoire de cellules intestinales Caco 2/15 dont le CFTR aura été invalidé génétiquement et/ou inhibé pharmacologiquement.
- 3) Explorer certains mécanismes par lesquels la vitamine D exercera ses propriétés anti-inflammatoires.

CHAPITRE 3. Matériels et méthodes

3.1 Culture des cellules intestinales Caco-2/15

Tout au long de ce projet de recherche le modèle de cellules intestinales humaines Caco-2/15 a été utilisé. Elles représentent un excellent modèle intestinal puisqu'elles ont la particularité de former des jonctions serrées, de présenter une bordure en brosse, de se différencier et d'acquérir les propriétés physiologiques de l'intestin grêle. Parmi ses multiples fonctions biologiques, elles ont également la capacité d'absorber des nutriments et des xénobiotiques, de produire et de sécréter des apolipoprotéines et des lipoprotéines (113). Les Caco-2/15 constituent un matériel issu d'intestin humain pour les études *in vitro* d'absorption et de métabolisme intestinal (114). Contrairement aux explants duodénaux et autres cellules intestinales primaires qui ont une survie très courte en culture, les cellules Caco-2/15 se cultivent pendant de longues périodes de temps.

Cette lignée cellulaire de carcinome de côlon est cultivée dans un incubateur à 37°C en atmosphère humide contrôlée à 5% de CO₂, dans du milieu *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM 1X) (Multicell Wisent INC.) contenant 1% de pénicilline/streptomycine et 1% d'acides aminés non essentiels (Multicell Wisent INC.) et supplémenté avec 5% de sérum de veau foetal (SVF) (Multicell Wisent INC.). Les cellules de passages 24-28 ont été utilisées pour les expériences et il s'agit de cellules en phase proliférative et non-différenciées.

3.2 Traitements des cellules intestinales

3.2.1 Manipulation du CFTR

3.2.1.1 Invalidation génique du CFTR

Pour reproduire le modèle de FK *in vitro*, nous avons procédé à l'invalidation de l'expression génique du CFTR des cellules Caco-2/15, en utilisant la méthode des ARN interférents (shRNA) via l'infection par lentivirus. Nous avons privilégié le système d'interférence basée sur un vecteur lentiviral d'expression de shRNA (short hairpin RNA) dont le promoteur assure

une transcription constante de ces ARN interférents pour un maintien à long terme, et non transitoire, de l'inhibition de l'ARNm. L'infection par les lentivirus, contrairement à la transfection traditionnelle, permet de transférer plus efficacement le vecteur d'expression du shRNA aux cellules Caco-2/15 qui sont polynucléées. Cette caractéristique cellulaire limite grandement l'efficacité de la transfection traditionnelle.

i) Production des lentivirus

Pour la construction des lentivirus, nous avons employé la technique de la transfection calcium/phosphate des cellules humaines embryonnaires de rein 293 (HEK293FT). Lors de cette transfection, trois plasmides viraux sont utilisés soient pLP1, pLP2 et pLP/VSVG (**Annexes 2-4**) ainsi que le vecteur pLKO.1 puromycine (**Annexe 1**) contenant l'insert shRNA spécifique à une séquence du CFTR (séquence FK966) ou *scrambled* (Scr), notre contrôle négatif. Tous ces vecteurs de même que l'insert shRNA sont disponibles commercialement (Addgene Plasmid Repository). Ces différents vecteurs, nécessaires à la construction des lentivirus spécifiques, ont été amplifiés préalablement par transformation bactérienne en utilisant les bactéries compétentes *OneShot Top 10* (Invitrogen C4040-10) puis purifiés par la méthode du chlorure de césium.

Le plasmide pLP1 possède le gène gag qui code pour la capsid (enveloppe) du lentivirus et le gène pol qui code pour les enzymes nécessaires à la réplication et à l'intégration du lentivirus dans le génome de la cellule hôte. Le plasmide pLP2 code pour la protéine Rev qui permet l'expression des gènes gag et pol ainsi que le transfert de l'ARN viral vers le cytosol pour l'assemblage du lentivirus. Enfin, le plasmide pLP/VSVG code pour la glycoprotéine G spécifique à l'enveloppe du virus *Vesicular Stomatitis*; permettant ainsi au lentivirus d'être utilisé sur un large éventail de types cellulaires. Trois jours d'incubation sont donc nécessaires pour l'expression de ces gènes et protéines par la cellule hôte, ainsi que pour la construction du lentivirus contenant notre plasmide d'intérêt. Les lentivirus fonctionnels lyseront ensuite la cellule hôte à la fin de cette incubation et seront récoltés dans le milieu de culture puis concentrés au moyen d'un dispositif de filtre centrifuge de type Amicon Ultra-15 (Millipore). Cette étape permet de concentrer environ 5 fois le lentivirus présent dans les surnageants.

ii) Infection des cellules

Afin de procéder à l'infection, les cellules Caco-2/15 sontensemencées sur des plaques de 6 puits en plastiques de 9,5 cm² (BD Falcon) à une densité de 5 x 10⁵ cellules par puits. Aux cellules en suspension, nous avons ajouté les lentivirus dilués 1/100 ainsi que 2µl de Polybrène (4mg/ml, Sigma Aldrich) pour augmenter l'entrée des lentivirus dans les cellules. Après 1 heure d'incubation à 37°C, 2 ml de EMEM supplémenté contenant du polybrène (4mg/ml) a été ajouté dans chaque puits pour aider au rétablissement des cellules.

iii) Amplification

Trois jours post-infection, les cellules sont décollées avec de la trypsine/EDTA. Après centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu EMEM supplémenté avec de la puromycine (2mg/ml, dilution 1/1000). Le vecteur pLKO.1 contenant un gène de résistance à la puromycine, la culture des cellules en présence de cet antibiotique permet ainsi de sélectionner les cellules ayant intégré ce vecteur. Les cellules sont réparties dans des pétris de 10 cm² pour amplification. Le milieu de culture est changé tous les 2 à 3 jours. Les cellules ont été employées pour les expériences subséquentes seulement après confirmation de la déplétion génique et protéique par les techniques de RT-PCR et Western blot (SDS-PAGE). Une fois cette confirmation obtenue, les cellules seront re-trypsinisées, comptées et réparties dans des plaques de 12 puits de 3,8 cm² en plastique, selon une densité de 2,5 x 10⁵ cellules / puits. Les cellules FK966 et Scr ont alors été utilisées telles quelles ou encore soumises à des traitements tel que décrit dans les sections qui suivent.

3.2.1.2 Inhibition pharmacologique du CFTR

Afin de définir si l'invalidation génique du CFTR se distingue de l'inhibition pharmacologique du CFTR, nous avons traité les cellules Scr avec un inhibiteur pharmacologique spécifique du CFTR, le CFTRinh-172 (Sigma Life science). Cet inhibiteur a été reconstitué dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) selon deux concentrations (5 et 20µM). Brièvement, les cellules Caco-2/15, infectées par Scr, ont été rincées 2 fois avec du PBS avant de subir le traitement avec l'inhibiteur spécifique du CFTR à chaque 24 heures pendant 72

heures. Le milieu est changé tous les 24 heures pour un milieu frais EMEM dépourvu de sérum mais contenant de la puromycine et l'inhibiteur. La durée du traitement ainsi que les doses d'inhibiteur pharmacologique ont été sélectionnées sur la base des données publiées dans l'article de Perez *et al.* (115). Ces auteurs démontrent une inhibition partielle et complète de l'activité du CFTR (tel que mesuré par le courant chlore) dans une lignée de cellules épithéliales trachéales d'origine humaine après 72 heures de traitement à 5 et 20 μ M respectivement. Pour le contrôle négatif, les cellules ont été incubées avec le même volume de DMSO que les cellules traitées avec 20 μ M de CFTRinh-172.

3.2.1.3 Double inhibition du CFTR

Afin de déterminer s'il existe un effet additif lorsque le CFTR est invalidé génétiquement et inhibé pharmacologiquement, nous avons également traité les cellules FK966 avec les mêmes concentrations de CFTRinh-172 et pour la même durée, tel que décrit dans le paragraphe précédent.

3.2.1.4 Activation du CFTR

Pour étudier l'activation pharmacologique du CFTR, un mélange de forskoline (10 μ M) (Sigma-# F6886-10MG) et de 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (100 μ M) (Sigma #I-7018) a été utilisé. La forskoline augmente la production d'AMPc qui, elle, augmente l'activité du CFTR. L'IBMX inhibe la phosphodiesterase, l'enzyme qui dégrade l'AMPc. L'utilisation conjointe de forskoline et d'IBMX permet de maintenir des niveaux intracellulaires élevés d'AMPc, ce qui assure l'activation du CFTR (116).

3.2.2 Induction d'un état pro-inflammatoire

Afin de caractériser la réponse inflammatoire suite à la manipulation génique et/ou pharmacologique du CFTR, les cellules soumises aux traitements précédents ont été stimulées en présence ou non des inducteurs inflammatoires suivants selon des durées bien précises et ce, dans un milieu non supplémenté (sans sérum):

- 8 et 24 heures avec le Tumor necrosis factor- α (TNF- α) et l'IL-1 β (Peprotech ; 25ng/ml) pour respectivement analyser l'expression de certains gènes par RT-PCR et mesurer la

sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 par immuno-enzymatique ELISA.

- 15, 30 et 60 minutes avec l'IL-1 β (25ng/ml) pour investiguer la voie de signalisation de la p38MAPKinases et de MKP-1 par Western Blot.

Le véhicule pour chaque cytokine est de l'H₂O Nano stérile.

3.2.3 Traitement à la vitamine D

Pour étudier le rôle anti-inflammatoire de la vitamine D au niveau intestinal, les cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été manipulé génétiquement et/ou pharmacologiquement ont été traitées pendant 24 heures avec la forme active de la vitamine D, la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ (Sigma) à une concentration de 10⁻⁷ et 10⁻⁹M, diluée dans l'éthanol. Afin d'avoir une condition contrôle, les cellules ont été incubées en présence de 0,4% d'éthanol, qui est le solvant dans lequel est dissout la 1,25-dihydroxyvitamine D₃. Cette concentration correspond à celle retrouvée dans les cellules traitées avec 10⁻⁷M de 1,25-dihydroxyvitamine D₃. Toutes ces expériences ont été réalisées dans un milieu de culture dépourvu de sérum.

3.2.4 Inhibition de la voie p38MAPK

Le Doramapimod (BIRB796 ;Selleckchem) est un inhibiteur de la phosphorylation de p38MAPK. Pour ces expériences, les cellules ont été pré-incubées avec le BIRB796 à des doses allant de 0,1 à 10 μ M pendant 30 minutes avant l'ajout de l'inducteur pro-inflammatoire IL-1 β . Ces expériences nous ont permis d'explorer par quelle voie, la vitamine D exerce ses actions anti-inflammatoires. Le véhicule pour le BIRB796 est de l'H₂O Nano stérile.

3.3 Essai de prolifération cellulaire par le test MTT

Le test MTT est un dosage colorimétrique qui permet une quantification très rapide de la prolifération et de la viabilité cellulaire et ce, en mesurant l'activité de la succinate deshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes (117). Plus il y a de cellules vivantes, plus il y a d'activité mitochondriale et donc plus de métabolisme du MTT. Cette enzyme coupe le cycle tétrazolium du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) de couleur jaune, ce qui résulte en la formation de cristaux de formazan violets.

Une fois les traitements terminés, les cellules sont lavées deux fois au PBS puis le test de prolifération est réalisé en ajoutant dans chaque puits la solution de MTT (Sigma) à une concentration finale de 0,5mg/ml. Après 4 heures d'incubation à 37°C, le MTT est retiré en gardant les plaques à l'envers plusieurs jours à 4°C. Une fois l'excédent de MTT retiré, du DMSO est ajouté dans chaque puits et les plaques sont ensuite agitées quelques secondes pour homogénéiser la coloration. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde entre 550 nm et de 600 nm, au moyen d'un spectrophotomètre. Le blanc de lecture correspond à des puits contenant seulement le DMSO. L'intensité de coloration est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Les résultats sont calculés en fonction de la concentration protéique totale et exprimés en pourcentage par rapport au contrôle négatif (cellules non-traitées).

3.4 Analyse de l'expression génique

3.4.1 Extraction et dosage des ARN totaux

Les ARN totaux sont d'abord extraits des cellules Caco-2/15 soumises aux différents traitements à l'aide de Trizol™ (Invitrogen) puis la quantité d'ARN extrait est quantifiée grâce au spectrophotomètre Nanovue Plus (GE). Le blanc de lecture est toujours fait avec de l'eau DEPC.

3.4.2 Transcription inverse (RT)

Pour procéder à la transcription inverse, le mélange pour 1 échantillon s'effectue en ajoutant 30ng d'amorces aléatoires (*Random Primers*), 1µl d'un mélange de dNTP à 10mM ainsi que 2µg d'ARN totaux. Le tout est chauffé à 65°C pendant 5 minutes. Ensuite, 4µl du tampon de réaction 5X (*First-Strand buffer*), 2µl de dithiothréitol (DTT) 0,1 M et 1µl de RNase Out est ajouté au mélange et chauffé à 37°C pendant 2 minutes. Le mélange est finalisé par l'ajout de 1µl de la transcriptase inverse M-MLV pour synthétiser de l'ADN complémentaire (ADNc) et chauffé à 25°C pendant 10 minutes, puis, à 37°C pendant 50 minutes et à 70 °C pendant 15 minutes (Protocole In Vitrogen, M-MLV#28025-013).

3.4.3 Réaction en chaîne par polymérase (PCR) et révélation

L'ADNc ainsi obtenu est amplifié par la réaction en chaîne par polymérase à l'aide d'une enzyme Taq polymérase (Bio Basic Canada Inc.). Seulement 1µl d'ADNc est nécessaire à la réaction d'amplification. Le mélange pour 1 gène d'intérêt est le suivant : 2,5µl de Tampon de

réaction 10X, 0,5µl d'un mélange de dNTP à 10mM, 0,5µl de l'amorce *Forward* et 0,5µl de l'amorce *Reverse* du gène d'intérêt, 2,5µl de *Band Sharpener* et 0,125µl de Taq polymérase. Le volume est complété à 24µl avec de l'H₂O DEPC auquel est ajouté 1µl d'ADNc. Les échantillons subissent d'abord une dénaturation de 10 minutes à 95°C. L'amplification nécessite en général de 20 à 40 cycles qui se déroulent de la façon suivante : une dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une hybridation à une température spécifique pour chaque paire d'amorces (ex: 58°C pour le 18S) pendant 45 secondes, puis une élongation à 72°C durant 1 minute. Le dernier cycle est suivi d'une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. Les différentes paires d'amorces utilisées et les conditions précises pour chacune d'elles sont détaillées dans le **Tableau 1**.

Nom du gène/protéine	Séquence de l'amorce 5' à 3' <i>Forward</i> <i>Reverse</i>	Taille du produit PCR (bp)	Température d'hybridation (°C)	Nombre de cycles
h18S	CCAGAGCGAAAGCATTTGCCAAGA AATCAACGCAAGCTTATGACCCGC	690	61,5	26
hCFTR	ATGCGATCTGTGAGCCGAGTCT TCTTCCCTGATCCAGTTCTTCCC	244	60	30
hCYP27B1	AACACGCTCTCTTGGGCTCTGTAT GCCATTTGCAATTCAAGCTCTGCC	433	61,5	35
hCYP24	TCAGCAGCCTAGTGCAGATTTCCCT TGCCTTGTCAAGAGTCCGAGTTGT	322	56,6	35
VDR	ATGGACTCGTCCAGCTTCTCCAAT TGGCACTTGACTTCAGCAGTACGA	214	56,7	35
hIL-8	AGACAGCAGAGCACACAAG GGGTGGAAAGGTTTGGAGTAT	215	62,1	40

Tableau 1 : Conditions de PCR pour les cellules Caco-2/15

Les amorces ciblaient dans la mesure du possible des exons séparés par un ou plusieurs introns afin de n'amplifier que l'ADNc et non l'ADN génomique contaminant. Toutes les amorces ont été soumises à une analyse BLAST afin de confirmer leur spécificité pour chaque gène. Ensuite, une mise au point a été faite pour chaque paire d'amorces afin de déterminer le nombre de cycles et la température d'hybridation optimale pour se trouver dans la phase exponentielle de l'amplification qui permet d'éviter la saturation du signal obtenu. Toutes les valeurs obtenues ont été normalisées avec le gène 18S, le gène codant pour l'ARN ribosomal 18S. Ce gène a été choisi pour la normalisation car son expression est constante et n'est pas influencée par les divers traitements. Les réactions de RT et PCR ont été réalisées au moyen d'un thermocycleur S1000 de BIO-RAD. Les produits de PCR ont été visualisés après leur migration sur un gel d'agarose de 1%. La quantification des amplicons a été réalisée à l'aide du logiciel UN-SCAN-IT gel 6.1 (Silk Scientific, Orem, USA).

3.5 Analyse de l'expression protéique

3.5.1 Extraction des protéines totales

Sur glace, le milieu est aspiré et les cellules sont rincées deux fois avec du PBS froid (4°C). Les protéines totales sont extraites par lyse cellulaire avec le réactif M-PER™ (Thermo Scientific) en présence des inhibiteurs de protéases suivant; hydroxytoluène butylé (BHT) 1%, fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) 100mM et Pepstatine A 250µg/ml. Les cellules sont ensuite soniquées afin d'obtenir des homogénats. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation pendant 5 minutes à 13000rpm. Le surnageant est par la suite récupéré pour procéder au dosage des protéines par la méthode de Bradford.

3.5.2 Préparation des échantillons

Une fois la concentration protéique dosée, les échantillons ont été dénaturés dans du tampon de Laemmli (Tris 125mM, pH=6,8, saccharose 10%, dodécylsulfate de sodium (SDS) 2%, β-mercaptoéthanol 1%, bleu de bromophenol 0,05%) et chauffés pendant 5 minutes.

3.5.3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les protéines dénaturées (15ug) ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide (30% acrylamide, 1M Tris-HCl pH 8,8, 10% SDS, 10% APS et Tétraméthyléthylènediamine (TEMED)). La concentration finale d'acrylamide du gel dépend de la taille de la protéine d'intérêt. Pour la protéine du CFTR, la concentration de polyacrylamide a été de 8% et pour les protéines p38MAPK et MKP-1, de 12%. La migration s'est faite dans un tampon fait de Tris 25mM, Glycine 190mM et SDS 0,01% sous une tension de 200V.

3.5.4 Transfert sur membrane PVDF

Les protéines du gel ont été transférées sur une membrane de polyvinyl difluoride (PVDF) pendant 1h à 4 °C à 100V dans du tampon de transfert (Tris 25mM, Glycine 190mM, 20% de méthanol). Le rouge de ponceau est ensuite appliqué sur la membrane afin de s'assurer que le transfert a bien fonctionné. La membrane est ensuite déposée 1 heure dans une solution qui contient 5% de lait écrémé en poudre avec du TBS-Tween (Tris 20mM, NaCl 137mM, pH=7,6 et Tween 20 0,1%) afin de bloquer les sites de liaison non spécifiques.

3.5.5 Immunodétection et révélation

La membrane est incubée avec agitation pendant une nuit à 4°C avec un anticorps primaire spécifique aux protéines étudiées. Après trois lavages avec du TBS-Tween 0,1%, la membrane est incubée pendant 1 heure avec un anticorps secondaire couplé à l'enzyme « *horseradish peroxidase* » (HRP), dirigé contre l'animal hôte dans lequel l'anticorps primaire a été produit. Les différents anticorps employés et leurs conditions d'utilisation sont décrits au **Tableau 2**. La β -actine a été utilisée comme protéine de normalisation.

Au terme de l'incubation avec l'anticorps secondaire, la membrane est à nouveau lavée 3 fois dans du TBS Tween 0,1% et 3 fois dans du TBS sans Tween. Finalement, la révélation est réalisée par chimioluminescence. Deux méthodes ont été utilisées pour la révélation du signal protéique : 1) un kit *BM Chemiluminescence Blotting Substrate*, (Roche Diagnostics) et 2) un kit *ECL Prime* (Amersham). Les signaux lumineux sont révélés sur un film dans la chambre noire. Après le développement des films, les bandes sont quantifiées en utilisant le logiciel UN-SCAN-IT gel 6.1.

Dans certains cas, il a été nécessaire de procéder au « *stripping* » de la membrane. Brièvement, la membrane est incubée pendant 20 minutes avec la solution Zm Tech (#S208070) puis rincée trois fois dans du TBS Tween 0,1%, suivi d'un blocage avant que la membrane soit à nouveau incubée avec un nouvel anticorps primaire.

Les anticorps primaires sont incubés dans du tampon TBS contenant 0,1% de Tween 20 et 5% d'albumine bovine et pour les anticorps secondaires les dilutions sont faites dans du TBS-Tween contenant 1% de lait écrémé en poudre.

Anticorps primaire	Espèce	Dilution	Cie	Anticorps Secondaire	Espèce	Dilution	Compagnie
β-actine	Souris	1/500 000	Sigma	Anti-Souris	Chèvre	1/20 000	Bio-Rad
CFTR	Lapin	1/1000	Cell Signaling	Anti-Lapin	Chèvre	1/10 000	Bio-Rad
Phospho-p38MAPK	Lapin	1/1000	Cell Signaling	Anti-Lapin	Chèvre	1/10 000	Bio-Rad
P38MAPK Total	Lapin	1/1000	Cell Signaling	Anti-Lapin	Chèvre	1/20 000	Bio-Rad
MKP-1	Lapin	1/1000	Santa Cruz	Anti-Lapin	Chèvre	1/10 000	Bio-Rad

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés pour les Western blot. Les dilutions pour les anticorps

3.6 Immunofluorescence

L'expression de NFκB a été vérifiée par immunofluorescence. Les cellules ont d'abord été ensemencées dans un système Lab-Tek II (Thermo Fisher Scientific INC) à une densité de 25 000 cellules par puits en présence de 500µl de milieu EMEM selon les conditions désirées. Après les divers traitements, les cellules ont été fixées grâce à une solution de 3,7% de paraformaldéhyde pendant 10 minutes. Par la suite, elles ont été perméabilisées avec 0,1% de Triton X-100 pendant 10 minutes, suivi d'un blocage de 30 minutes avec 1% d'albumine bovine. Toutes les solutions ont été faites à partir de PBS 1X. Une fois la solution de blocage retirée, les cellules ont été incubées 1 heure avec l'anticorps primaire phospho-NFκB produit chez le lapin (Cell Signaling) dilué 1/100 dans la solution de blocage. Après 3 lavages avec du PBS 1X, les cellules ont été incubées 1 heure en présence de l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à un fluorochrome le *Dylight 594* dilué 1/50 dans la solution de blocage. En parallèle, la même méthode a été effectuée avec l'anticorps primaire NFκB total produit chez la chèvre (Santa Cruz) dilué 1/100 ainsi que l'anticorps secondaire anti-chèvre couplé à un fluorochrome le *Dylight 594* dilué 1/100. Après l'incubation avec l'anticorps secondaire, les cellules sont à nouveau lavées 3 fois avec la solution de blocage et 2 fois au PBS 1X. Le montage des lames est effectué en retirant d'abord la chambre de milieu de culture du système Lab-Tek pour ajouter 2 gouttes de *ProLong Gold antifade reagent* couplé avec le 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (Life Technologies). Les lames sont gardées dans la noirceur pendant 12 heures avant d'être observées avec un microscope à fluorescence à une magnification de 40X (Leica DMR).

3.7 Réaction immuno-enzymatique de type ELISA

La méthode ELISA en sandwich a été réalisée pour déterminer quantitativement la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-8, grâce à un kit fourni par la compagnie BD Biosciences (BD OptEIA™ Human IL-8 ELISA Kit II). Une plaque de 96 puits est déjà pré-revêtue d'un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement l'IL-8. Les surnageants des différentes cultures cellulaires ont été récoltés puis conservés à -80 °C jusqu'à la mesure de l'IL-8.

Chaque échantillon dilué 1/10 dans le ‘‘*Standard/Sample diluent buffer*’’ ainsi que ceux préparés pour la réalisation de la courbe d’étalonnage ont été déposés dans les puits. La streptavidine couplée à l’enzyme HRP est mélangée avec l’anticorps anti-humain IL-8 et déposée dans chaque puits afin de reproduire la technique Sandwich (anticorps-antigène-anticorps). Les puits sont lavés 7 fois suivi de l’ajout du substrat *TMB One-Step* qui produit une couleur bleue directement proportionnelle à la quantité d’IL-8 présente dans chacun des échantillons. L’absorbance est mesurée à une longueur d’onde de 450nm, au moyen d’un lecteur de plaques ELISA (Multiskan EX, Labsystems).

3.8 Statistiques

Les résultats présentés sont la moyenne des échantillons \pm l’erreur standard de la moyenne (SEM). Les différences des moyennes entre plusieurs groupes ont été testées à l’aide de l’analyse de variance (ANOVA). Pour évaluer les différences entre deux groupes expérimentaux le test t de Student a été utilisé. Une valeur $p < 0,05$ a été considérée statistiquement significative. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS, Version 21.

CHAPITRE 4. Résultats

Deux grands volets expérimentaux sont présentés dans la section résultats : (i) Le rôle étiologique du CFTR et (ii) les propriétés anti-inflammatoires de la vitamine D dans l'inflammation intestinale associée à la FK

4.1 Rôle du CFTR comme facteur étiologique de l'inflammation intestinale liée à la FK

4.1.1 Validation du modèle d'inactivation génique du CFTR

Dans un premier temps, nous avons voulu quantifier le degré d'inactivation génique et protéique du CFTR suite à l'infection lentivirale des cellules intestinales Caco-2/15. Les cellules infectées avec un lentivirus renfermant une séquence *Scrambled* ont été utilisées comme contrôle négatif puisque nous avons antérieurement démontré que l'expression du CFTR des cellules Scr est équivalente à celle de cellules Caco-2/15 non-infectées (118, 119). Une réduction significative de l'expression génique du CFTR de 52% a été observée dans les cellules infectées avec les shRNAs dirigés contre le CFTR par rapport aux cellules infectées avec le lentivirus renfermant la séquence Scr (**Figure 9A**). Il en résulte une expression protéique du CFTR réduite de 39% par rapport aux cellules contrôles (**Figure 9B**).

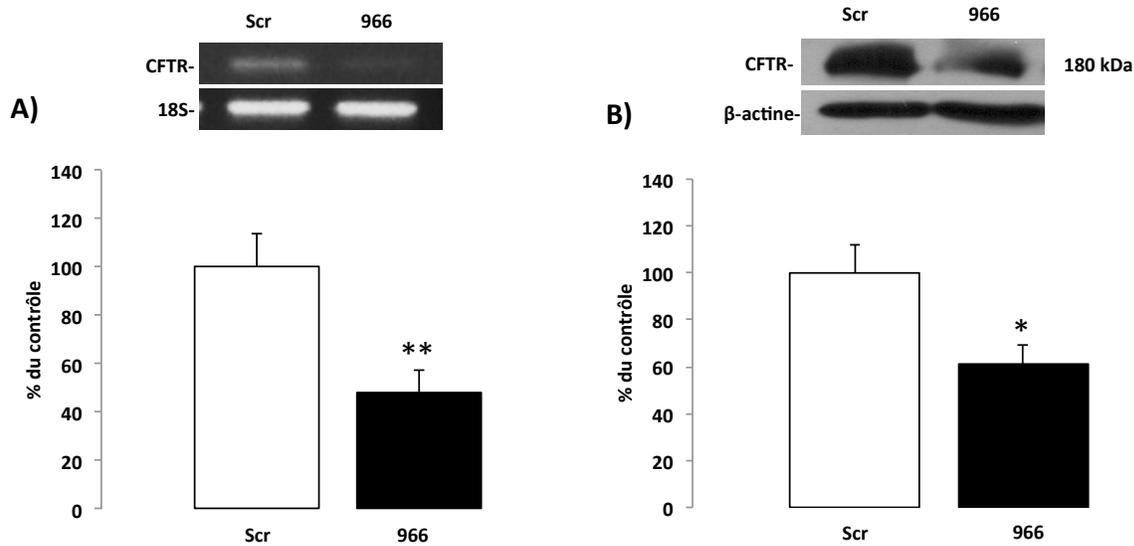


Figure 9. Expression génique et protéique du CFTR dans les cellules Caco-2/15 infectées avec des shRNAi Scr ou dirigés contre le CFTR. Après l'infection par les lentivirus, les cellules Caco-2/15 prolifèrent jusqu'à confluence avant d'être récoltées pour déterminer (A) l'expression génique et (B) protéique du CFTR. Une RT-PCR a été réalisée après extraction des ARN totaux des cellules Caco-2/15. L'expression protéique du CFTR a été évaluée par Western Blot. Les cellules Scr ont été infectées avec un lentivirus renfermant une construction shRNAi ne ciblant aucun transcrite endogène (contrôle négatif). Les résultats d'expression génique et protéique sont normalisés respectivement par l'expression du 18S et de la β -actine et ont exprimés en % du contrôle (cellules Scr). Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM obtenue à partir de 16 expériences distinctes pour l'expression génique et 4 expériences distinctes pour l'expression protéique. Le test t de Student a été utilisé pour comparer les moyennes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs cellules Scr.

4.1.2 Impact de la manipulation du CFTR sur le profil inflammatoire de la cellule Caco-2/15

a) Sécrétion d'interleukine-8

À l'instar d'autres modèles cellulaires FK, nous postulons que la manipulation génétique et/ou l'inhibition pharmacologique du CFTR intestinal induira une réponse inflammatoire exagérée.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 dans le surnageant de cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été invalidé génétiquement et/ou inhibé pharmacologiquement. L'IL-8 est une chimiokine produite par les cellules épithéliales suite à une réponse inflammatoire excessive (120). La production d'IL-8 est souvent augmentée lors de maladies inflammatoires dont, entre autres, la FK. L'IL-8 stimule la migration des neutrophiles vers les sites d'inflammation et cause leur activation en régulant notamment l'expression neutrophilique de molécules d'adhérence. Donc, par le recrutement et l'activation des cellules immunitaires, l'IL-8 est un médiateur important de la réaction immunitaire et joue rôle important dans le contrôle de l'inflammation (121).

Les mesures d'IL-8 ont été réalisées à l'état basal et suite à une stimulation (24h) avec deux agents pro-inflammatoires ; TNF- α et IL-1 β . Ces deux inducteurs sont largement utilisés dans les études *in vitro* afin de mieux comprendre les mécanismes associés aux maladies inflammatoires. Ils stimulent tous les deux la sécrétion d'IL-8.

À l'état basal, en absence de toute stimulation, les cellules invalidées génétiquement pour le CFTR démontrent une sécrétion d'IL-8 plus élevée avec une concentration de 0,012 pg/ml/mg comparativement aux cellules contrôles qui représente une concentration d'IL-8 de 0,007 pg/ml/mg. (**Figure 10A**). L'ajout de TNF- α (25ng/ml) ou d'IL-1 β (25ng/ml) entraîne un accroissement de la sécrétion d'IL-8 qui est plus marquée chez les cellules dont le CFTR a été invalidé génétiquement. Nous constatons une réponse inflammatoire plus élevée lorsque les cellules sont stimulées avec l'IL-1 β . L'inhibition pharmacologique de la fonction du CFTR couplée ou non à l'invalidation génique n'entraîne aucune augmentation significative de la sécrétion d'IL-8 suite à un traitement au TNF- α ou à l'IL-1 β (**Figure 10B et C**). Finalement, à titre de contrôle positif, nous avons activé le CFTR à l'aide d'un mélange de forskoline pour stimuler l'adénylate cyclase, l'enzyme qui catalyse la synthèse d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) nécessaire à l'activation du CFTR, et d'IBMX qui inhibe la phosphodiesterase, l'enzyme qui dégrade l'AMPc. Cette condition nous a permis de comparer l'effet de la hausse d'AMPc chez les Caco-2/15 lorsque celles-ci ont été incubées ou non en présence d'inducteurs inflammatoires. La **Figure 10D** nous illustre que cette hausse de

l'AMPc provoque une diminution significative de la sécrétion d'IL-8 en réponse au TNF- α ou à l'IL-1 β alors que le mélange forskoline-IBMX n'exerce aucun effet sur la sécrétion basale d'IL-8.

En résumé, cette série d'expériences nous permet d'affirmer que, face à un inducteur pro-inflammatoire, les cellules Caco-2/15 dont le CFTR intestinal a été invalidé génétiquement répondent à des agents pro-inflammatoires par une sécrétion d'IL-8 plus élevée comparativement aux cellules contrôles.

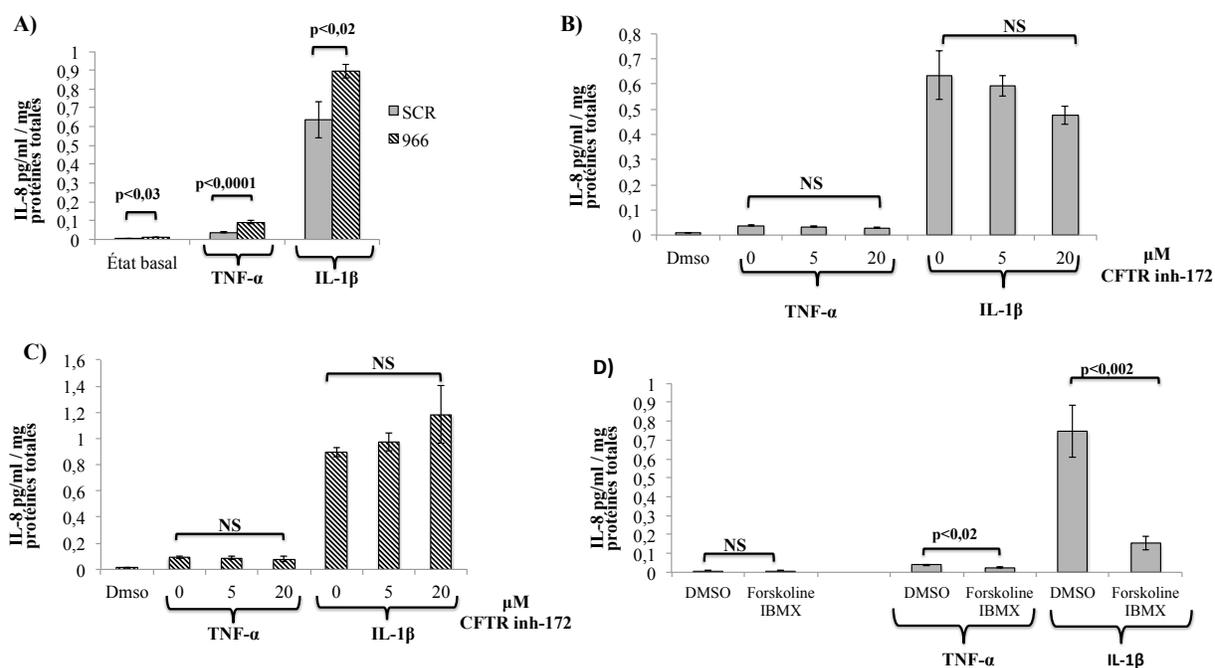


Figure 10. Sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 par les cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été manipulé et stimulées ou non pendant 24 heures par les inducteurs pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β à une concentration de 25 ng/ml. **A)** Invalidation génétique du CFTR (construction 966); **B)** Inhibition pharmacologique par 5 et 20 μ M de l'inhibiteur spécifique du CFTR, CFTRinh-172; **C)** Combinaison de l'invalidation génétique et de l'inhibition pharmacologique (5 et 20 μ M) **D)** Activation du CFTR par la forskoline (10 μ M) et l'IBMX (100 μ M) à titre de contrôle positif. La mesure d'IL-8 dans le surnageant des cellules a été réalisée par ELISA. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 5 à 8 expériences distinctes. Les comparaisons de moyennes ont été réalisées par un test t de Student ou par analyse de variance le cas échéant.

b) Expression génique d'IL-8

Dans le but de déterminer quels sont les mécanismes à l'origine de l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 lorsque le CFTR des cellules intestinales est déplété génétiquement, nous avons mesuré le niveau d'expression génique de l'IL-8 par RT-PCR. Bien que l'expression génique d'IL-8 est induite par l'ajout d'un inducteur pro-inflammatoire, la **Figure 11** nous montre qu'il n'y a aucune différence significative au niveau de l'expression basale ou stimulée de l'IL-8 entre les cellules dont le CFTR a été invalidé et/ou inhibé et les cellules contrôles. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 observée lors de l'invalidation génique du CFTR des cellules Caco-2/15 n'est donc pas causée par une induction de son expression génique.

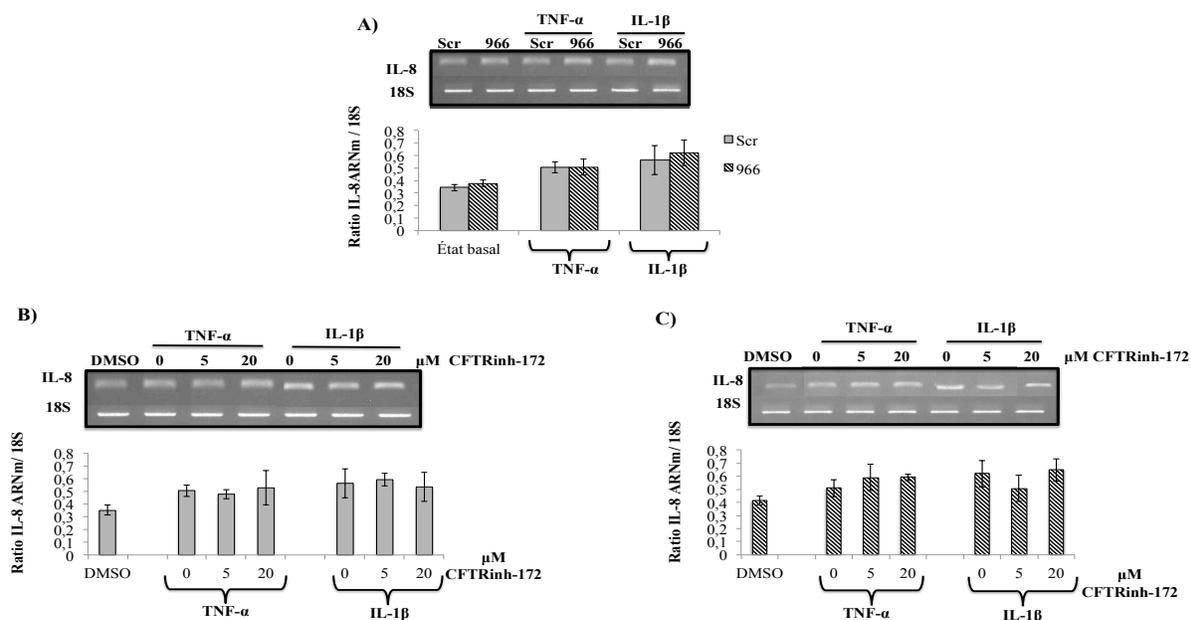


Figure 11. Expression génique de l'IL-8 des Caco-2/15 dont le CFTR a été manipulé et stimulé pendant 8 heures par le TNF- α et IL-1 β à une concentration de 25 ng/ml. Suite à l'extraction des ARN totaux, l'expression d'IL-8 a été déterminée par RT-PCR. Niveau d'expression d'ARNm de l'IL-8 des Caco-2/15 dont le CFTR a été (A) invalidé génétiquement (construction 966); (B) inhibé pharmacologiquement ou (C) la combinaison des deux. Les résultats d'expression génique ont été normalisés en fonction de l'expression de l'ARN ribosomal 18S. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences distinctes. Résultats non-significatifs (NS).

c) Expression et niveau de phosphorylation de la voie p38MAPK

Comme l'ajout de cytokines pro-inflammatoires telles TNF- α ou IL-1 β active des voies de signalisation cellulaire pro-inflammatoires situées en amont de la sécrétion d'IL-8 (122, 123), nous avons investigué si la manipulation du CFTR des cellules Caco-2/15 module l'activation (via le phénomène de phosphorylation) et l'expression de la voie p38MAPK, ce qui pourrait expliquer l'effet observé sur la sécrétion d'IL-8. Dans ces expériences, nous n'avons utilisé que l'IL-1 β car il s'agit de la cytokine qui induisait une plus grande sécrétion d'IL-8.

L'ajout d'IL-1 β cause une augmentation rapide de la phosphorylation de p38MAPK. Par contre, la **Figure 12A** montre que le niveau de phosphorylation de p38MAPK n'est pas modifié après l'inactivation génique du CFTR comparativement au Caco-2/15 dont le CFTR est intact (Scr) et ce, après stimulation par l'IL-1 β à des temps courts (15, 30 et 60 minutes). De même, la phosphorylation de p38MAPK en réponse à l'IL-1 β n'est pas influencée par l'inhibition pharmacologique du CFTR (**Figure 12B**) ou encore par la combinaison de l'inactivation génique et de l'inhibition de la fonction du CFTR (**Figure 12C**).

En résumé, cette série d'expériences démontre que, en situation inflammatoire, l'inactivation génique et/ou l'inhibition pharmacologique du CFTR n'a pas d'impact sur le niveau de phosphorylation de p38MAPK comparativement aux cellules contrôles. Ainsi, la hausse de la sécrétion d'IL-8 observée chez les cellules déplétées génétiquement pour le CFTR ne semble pas attribuable à une altération de la voie p38MAPK aux temps qui ont été testés.

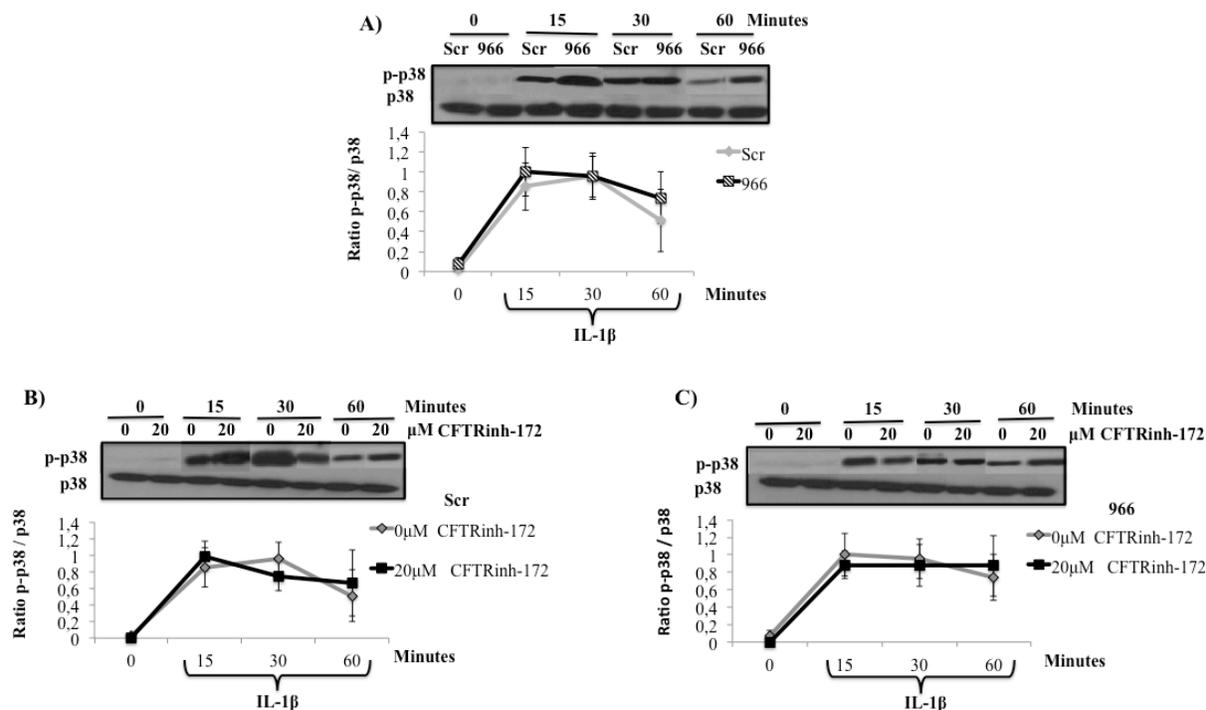


Figure 12. Effet de la manipulation du CFTR sur la phosphorylation de p38MAPK. L'expression protéique de la forme phosphorylée et totale de p38MAPK a été déterminée par Western Blot sur les Caco-2/15 dont le CFTR a été (A) invalidé génétiquement (construction 966); (B) inhibé pharmacologiquement ou (C) la combinaison des deux. Les cellules ont été incubées avec de l'IL-1 β (25ng/ml) et récoltées après 15, 30 ou 60 minutes de traitement. Les cellules récoltées au temps 0 n'ont pas été exposées à la cytokine pro-inflammatoire et représentent l'état basal. Les résultats sont exprimés en ratio de l'expression de la forme phosphorylée de p38MAPK sur son expression totale. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences distinctes. Résultats non-significatifs (NS).

d) Expression et niveau de phosphorylation du facteur de transcription NFκB

NFκB est un facteur de transcription impliqué dans plusieurs maladies inflammatoires telles que les maladies inflammatoires de l'intestin(124). Une augmentation de l'expression de ce facteur a été rapportée chez les patients FK. En effet, les tissus FK présentent une diminution de *l'inhibitor of kappa B* (IκB) une protéine située dans le cytosol qui se lie au NFκB afin de l'empêcher de se rendre au noyau pour moduler la transcription de facteurs pro-inflammatoires (124). NFκB représente le point de convergence des signaux extracellulaires responsables de l'induction de gènes impliqués dans les réponses pro-inflammatoires y compris IL-8. Afin d'explorer plus en détail les voies moléculaires responsables de l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 lors de l'inactivation génique du CFTR, nous avons investigué l'expression et le niveau de phosphorylation de NFκB des cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été déplété ou non génétiquement. Encore ici, nous n'avons étudié que l'effet de l'IL-1β sur la phosphorylation de NFκB.

À l'état basal, en absence d'un inducteur inflammatoire, nous pouvons constater une légère augmentation du niveau de phosphorylation de NFκB lorsque le CFTR est invalidé génétiquement (966) comparativement aux cellules dont le CFTR est intact (Scr). L'ajout d'IL-1β entraîne une augmentation du niveau de phosphorylation de NFκB qui apparaît légèrement plus marquée lorsque le CFTR est invalidé génétiquement (966) comparativement aux cellules Scr (**Figure 13**). Il est à préciser que les résultats d'immunofluorescence ne nous permettent pas de quantifier avec précision l'expression et le niveau de phosphorylation de NFκB mais plutôt de procéder à une évaluation qualitative.

En résumé, nous ne pouvons conclure avec certitude que l'inactivation génique du CFTR intestinal provoque une augmentation du niveau de phosphorylation de NFκB suite à l'ajout d'un inducteur pro-inflammatoire.

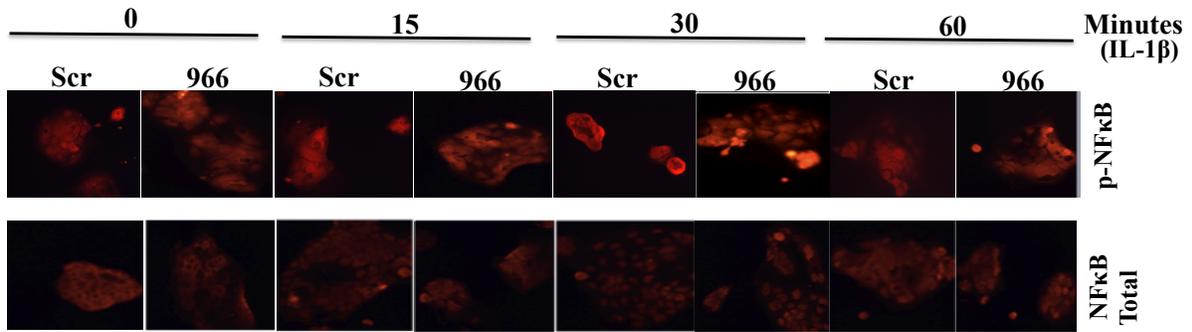


Figure 13. Impact de l'inactivation génique du CFTR sur l'expression protéique de la forme phosphorylée et totale du facteur de transcription NFκB. L'expression de NFκB a été visualisée par immunofluorescence sur les Caco-2/15 dont le CFTR a été invalidé génétiquement (construction 966) suivi d'une stimulation par IL-1 β (25ng/ml) pendant 15, 30 ou 60 minutes. Les cellules récoltées au temps 0 n'ont pas été exposées à l'IL-1 β . Les cellules infectées avec le lentivirus renfermant la séquence aléatoire Scrambled (Scr) ont servi de contrôle négatif. Les images montrées sont représentatives d'une expérience qui a été répétée 4 fois avec les mêmes résultats.

4.2 Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur le profil inflammatoire de la cellule Caco-2/15 suite à la manipulation du CFTR.

La vitamine D est d'une grande importance dans la régulation de plusieurs processus biologiques, puisqu'elle favorise, entre autres, l'absorption du calcium et du phosphore, elle participe au maintien de la force musculaire, elle module le système immunitaire et possède des propriétés anti-prolifératives et anti-inflammatoires (71). Comme nous avons préalablement observé que la déplétion génique du CFTR augmentait la sécrétion d'IL-8 au sein de la cellule Caco-2/15, nous avons émis l'hypothèse que la vitamine D viendra moduler à la baisse le profil inflammatoire de la cellule intestinale dont le CFTR aura été manipulé. Le deuxième volet de ce projet vise donc à évaluer si l'ajout de la forme bioactive de la vitamine D permettra de moduler le profil inflammatoire de cellules intestinales Caco 2/15 dont le CFTR aura été altéré et d'explorer certains mécanismes par lesquels la vitamine D exercera ses propriétés anti-inflammatoires.

a) Sécrétion d'interleukine-8

La déplétion génique du CFTR semble avoir un impact sur l'augmentation de l'inflammation au niveau intestinal, puisque nous avons détecté une hausse significative de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 chez nos cellules dont le CFTR est invalidé génétiquement. Nous postulons que, par ses propriétés anti-inflammatoires, la vitamine D viendra moduler à la baisse le profil inflammatoire de la cellule intestinale dont le CFTR aura été manipulé génétiquement et/ou pharmacologiquement. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons, dans un premier temps, mesuré la sécrétion de l'IL-8 dans le surnageant de cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été invalidé génétiquement et/ou inhibé pharmacologiquement et ce, après un traitement ou non de 24 h avec la forme bioactive de la vitamine D, la 1,25(OH)₂D₃. Cet ajout de 1,25(OH)₂D₃ a été fait simultanément aux traitements avec les deux inducteurs pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β .

La **Figure 14** nous montre les sécrétions d'IL-8 suite à un traitement au TNF- α en présence ou non de 1,25(OH) $_2$ D $_3$. D'après la **Figure 14A**, suite à l'inactivation du CFTR (construction 966), la sécrétion d'IL-8 induite par le TNF- α diminue de 0,092pg/ml/mg chez les cellules non-traitées à 0,062pg/ml/mg chez les cellules traitées avec 10 $^{-9}$ M de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (p=0,09). Cependant, nous observons une diminution plus marquée de la sécrétion d'IL-8 induite par le TNF- α lorsque les cellules sont pré-traitées avec une concentration plus élevée de 1,25(OH) $_2$ D $_3$. En effet, le niveau de la sécrétion d'IL-8 diminue de 0,092pg/ml/mg chez les cellules non-traitées à 0,050pg/ml/mg chez les cellules traitées avec 10 $^{-7}$ M de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (p=0,02). Étonnamment, l'effet de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ n'est observé que chez les cellules invalidées génétiquement pour le CFTR. En effet, les cellules Scr traitées à la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ ne démontrent aucune variation de la sécrétion d'IL-8 induite par le TNF- α .

Suite à l'inhibition pharmacologique du CFTR, nous ne notons aucun effet significatif de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ sur le niveau de sécrétion d'IL-8 en réponse au TNF- α (**Figure 14B**). Si nous procédons à l'inactivation et l'inhibition pharmacologique de l'activité du CFTR à une concentration de 5 μ M, nous observons un effet de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$, à 10 $^{-7}$ M puisque celle-ci diminue la sécrétion d'IL-8 de 0,087pg/ml/mg à 0,052pg/ml/mg. Toutefois, cet effet n'est pas significatif (p=0,08). À une concentration plus forte d'inhibiteur (20 μ M), la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ n'a aucun effet sur la sécrétion d'IL-8 induite par le TNF- α (**Figure 14C**).

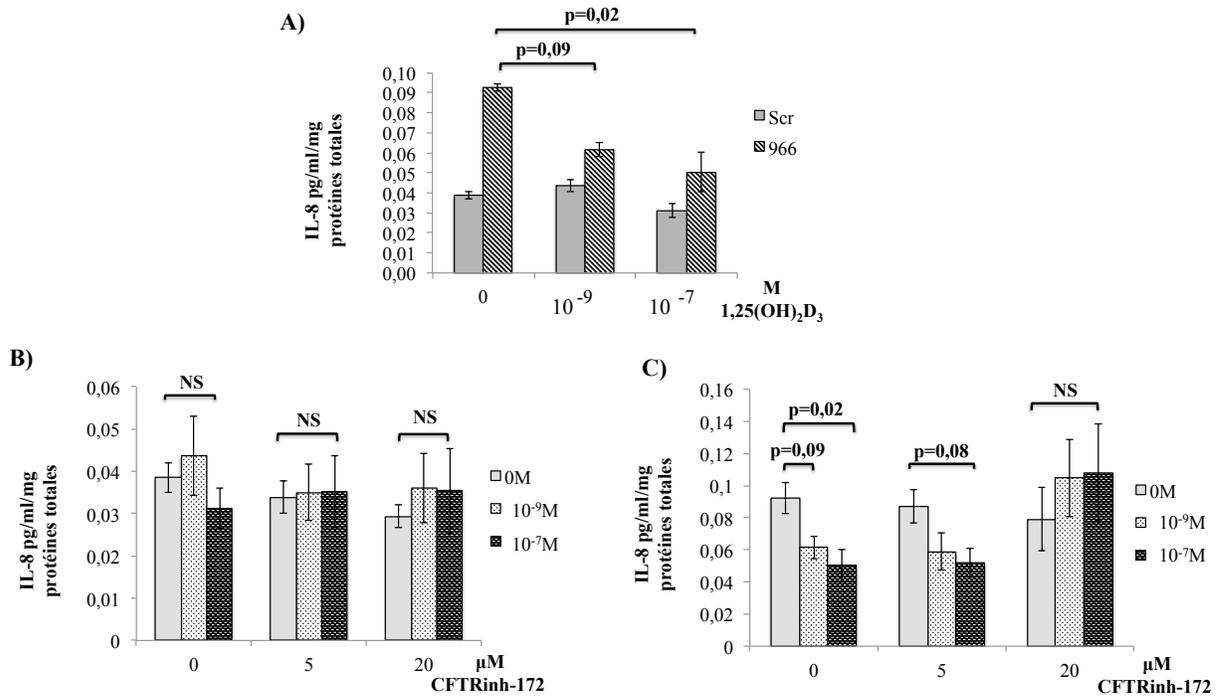


Figure 14. Effet de la 1,25 (OH)₂D₃ sur la sécrétion d’IL-8 par les cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été manipulé et stimulées pendant 24 heures par l’inducteur pro-inflammatoire TNF- α à une concentration de 25 ng/ml. **A)** Invalidation génique du CFTR (construction 966); **B)** inhibition pharmacologique par 5 et 20 μ M de CFTRinh-172; **C)** combinaison de l’invalidation génique et de l’inhibition pharmacologique du CFTR. La mesure d’IL-8 dans le surnageant des cellules a été réalisée par ELISA. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 5 à 8 expériences distinctes. Les comparaisons de moyennes ont été réalisées par analyse de variance suivie d’un test posthoc de Tukey pour les comparaisons deux à deux.

Les mêmes expériences ont été faites sur les cellules Caco2/15 traitées à l’IL-1 β , une cytokine qui induit plus fortement la sécrétion d’IL-8 que le TNF- α . Selon la **Figure 15A**, nous remarquons une diminution significative de la sécrétion d’IL-8 induite par l’IL-1 β suite à un traitement avec la plus forte concentration de 1,25(OH)₂D₃. Le niveau de sécrétion d’IL-8 passe de 0,894pg/ml/mg par les cellules non-traitées à 0,654pg/ml/mg (p=0,05) par celles ayant reçu un traitement à la 1,25(OH)₂D₃. Encore ici, nous constatons aucun effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la sécrétion d’IL-8 des cellules Scr.

En ce qui a trait aux cellules dont le CFTR est inhibé pharmacologiquement, nous observons une augmentation significative, plutôt qu'une diminution, de la sécrétion d'IL-8 induite par l'IL-1 β en réponse à la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ qui passe de 0,475pg/ml/mg chez les cellules non-traitées à 0,572pg/ml/mg (p=0,033) chez les Caco-2/15 traitées avec 10 $^{-7}$ M de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (**Figure 15B**).

Nous observons une diminution de la sécrétion d'IL-8 de 0,973pg/ml/mg à 0,712pg/ml/mg (p=0,08) chez les cellules ayant subi une invalidation génique et une inhibition pharmacologique du CFTR (5 μ M) et soumises à un traitement à la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ de 10 $^{-9}$ M. Toutefois, l'ajout d'une plus forte concentration de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10 $^{-7}$ M) à ces cellules a provoqué une réduction significative de la sécrétion d'IL-8 qui est passée de 0,973 pg/ml/mg à 0,601pg/ml/mg (p=0,014) comparativement aux cellules-contrôles (Ctrl) qui n'ont pas été traitées par la 1,25(OH) $_2$ D $_3$. Par contre, à une concentration plus forte de CFTRinh-172 (20 μ M), la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ ne provoque aucun changement significatif de la sécrétion d'IL-8 (**Figure 15C**).

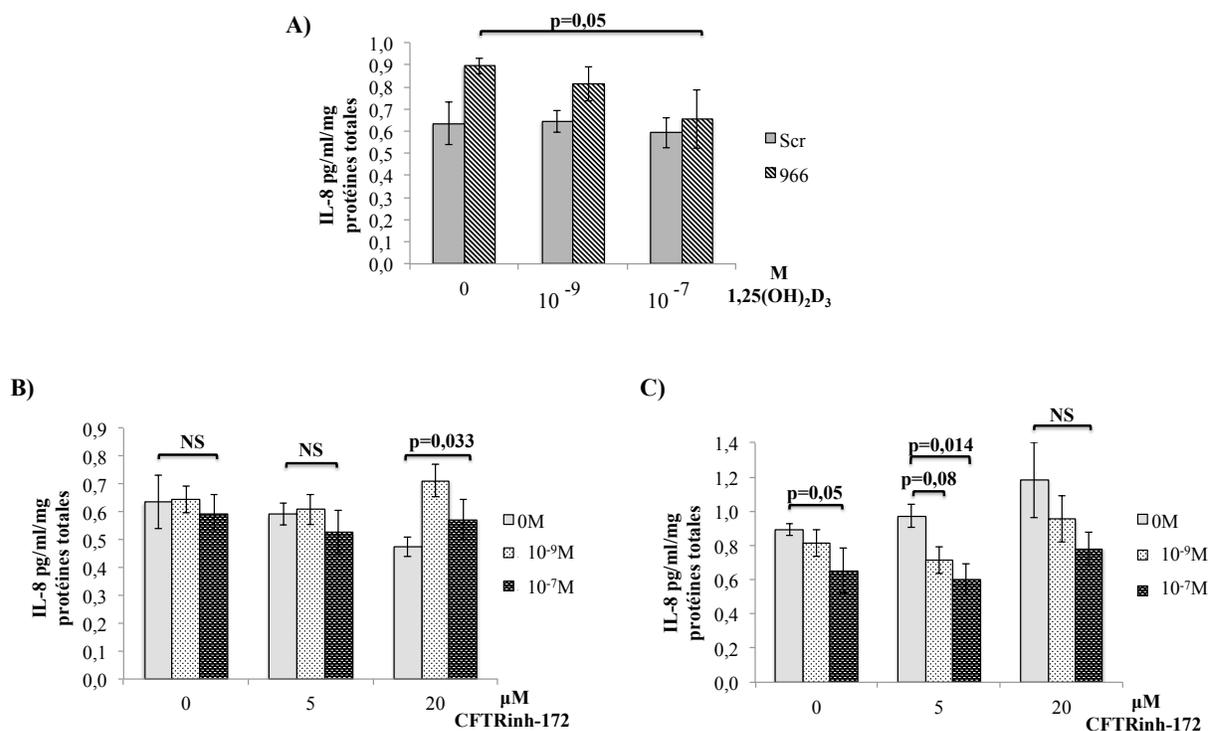


Figure 15. Effet de la 1,25 (OH)₂D₃ sur la sécrétion d'IL-8 par les cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été manipulé et stimulées pendant 24 heures par l'inducteur pro-inflammatoire IL-1β à une concentration de 25 ng/ml. **A)** Invalidation génique du CFTR (construction 966); **B)** inhibition pharmacologique par 5 et 20μM de CFTRinh-172; **C)** combinaison de l'invalidation génique et de l'inhibition pharmacologique du CFTR. La mesure d'IL-8 dans le surnageant des cellules a été réalisée par ELISA. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de 5 à 8 expériences distinctes. Les comparaisons de moyennes ont été réalisées par analyse de variance suivie d'un test posthoc de Tukey pour les comparaisons deux à deux.

Ces résultats suggèrent que la vitamine D exerce une action anti-inflammatoire puisque celle-ci réduit à forte concentration la production d'IL-8 induite par les cytokines TNF-α ou l'IL-1β des cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été manipulé génétiquement et ce, en présence ou non de l'inhibiteur pharmacologique.

b) Expression génique d'IL-8

Dans le but de déterminer quels sont les mécanismes par lesquels la vitamine D exercera ses propriétés anti-inflammatoires, nous avons d'abord mesuré le niveau d'expression génique de l'IL-8 des cellules Caco-2/15 soumises à nos différentes conditions expérimentales. Comme la vitamine D est connue pour moduler l'expression génique de plusieurs cibles, ceci pourrait être un mécanisme expliquant son effet sur la sécrétion d'IL-8. Contrairement à notre hypothèse, nous ne constatons aucun effet significatif de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur l'expression génique de l'IL-8 des cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été invalidé et/ou inhibé après stimulation avec les cytokines pro-inflammatoires $\text{TNF-}\alpha$ ou $\text{IL-1}\beta$ (25ng/ml) (**Figure 16**). Ces résultats suggèrent que l'effet de la vitamine D sur la sécrétion d'IL-8 ne passe pas par une modulation de son expression génique.

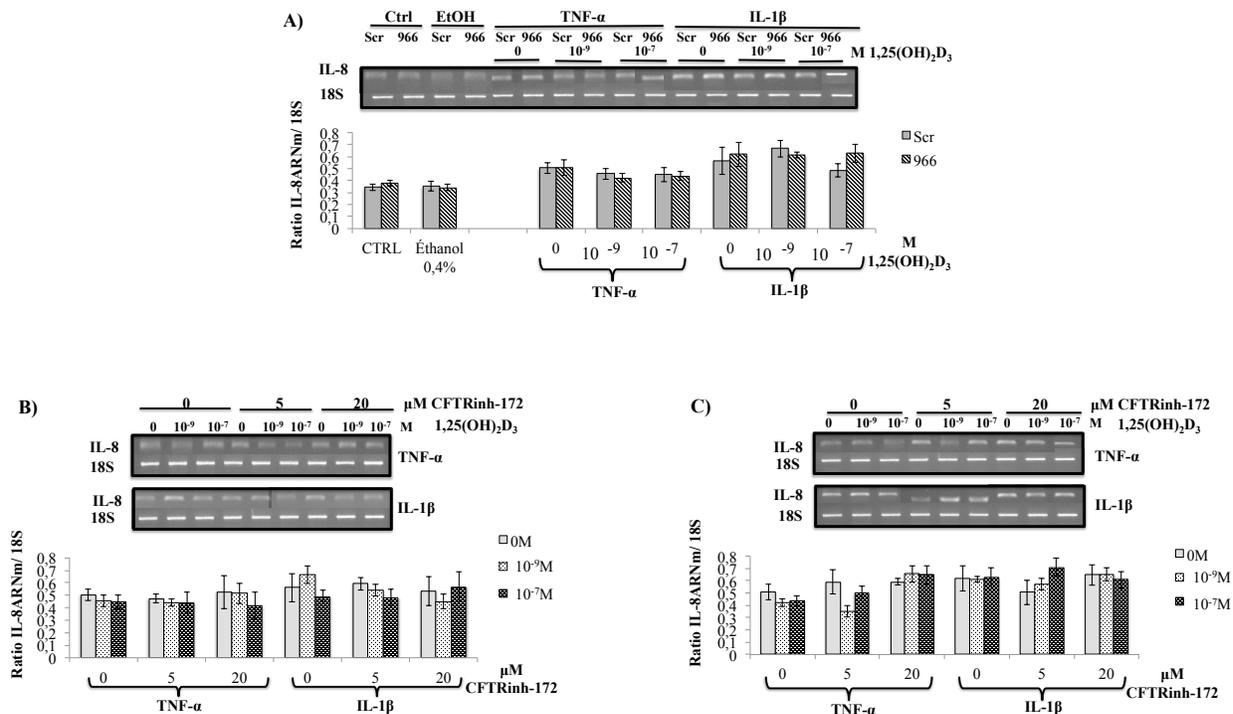


Figure 16. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur l'expression génique de l'IL-8 des Caco-2/15 dont le CFTR a été modifié. Les Caco-2/15 ont été traitées à la 1,25 (OH)₂D₃ pendant 24 heures et stimulées par les cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IL-1β selon une concentration de 25 ng/ml pendant les dernières 8 heures. Suite à l'extraction des ARN totaux, l'expression d'IL-8 a été déterminée par RT-PCR. Niveau d'expression d'ARNm de l'IL-8 des Caco-2/15 dont le CFTR a été **(A)** invalidé génétiquement (construction 966); **(B)** inhibé pharmacologiquement ou **(C)** la combinaison des deux. Les résultats d'expression génique ont été normalisés en fonction de l'expression de l'ARN ribosomal 18S. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de 4 expériences distinctes. Les comparaisons de moyennes ont été réalisées par analyse de variance. Tous les résultats sont non-significatifs (NS).

c) Expression et niveau de phosphorylation de la voie p38MAPK

Il est tout à fait connu que l'inflammation chronique de l'intestin implique l'activation de certaines voies de signalisation pro-inflammatoires dont, entre autres, la voie de p38MAPK. Nous postulons que la vitamine D, pourrait exercer son effet anti-inflammatoire en diminuant l'activation de cette voie. Ainsi, nous avons investigué si l'ajout de 1,25(OH)₂D₃ suite à la

manipulation du CFTR des cellules Caco-2/15 module le niveau d'expression et de phosphorylation de p38MAPK. Les cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été invalidé et/ou inhibé ont été traitées avec de la 1,25(OH)₂D₃ pendant 24 heures et stimulées à court terme (30 minutes) par l'IL-1β. L'expression de la forme phosphorylée et totale de p38MAPK a ensuite été déterminée par Western Blot. Ces expériences et les suivantes n'ont été faites qu'avec l'IL-1β qui est la cytokine induisant une plus grande sécrétion d'IL-8.

D'après la **Figure 17A**, le traitement des cellules invalidées génétiquement avec 10⁻⁹M 1,25(OH)₂D₃ tend à induire une diminution du niveau de phosphorylation de p38MAPK de 66% par rapport aux cellules non-traitées à la 1,25(OH)₂D₃ (p=0,07). Cette tendance est similaire à celle observée chez les cellules invalidées pré-traitées avec 10⁻⁷M de 1,25(OH)₂D₃ (64% ; p=0,08). Encore ici, nous remarquons que la 1,25(OH)₂D₃ n'exerce aucun effet sur le niveau de phosphorylation de p38MAPK des cellules Scr.

Au niveau des cellules dont le CFTR a été inhibé pharmacologiquement (20μM de CFTRinh-172), nous ne constatons aucun effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la phosphorylation de p38MAPK comparativement aux cellules non-traitées (**Figure 17B**).

Finalement, nous observons une réduction de 41% de la phosphorylation de p38MAPK suite au traitement avec 10⁻⁹M de 1,25(OH)₂D₃ des cellules ayant subi à la fois une invalidation génique et une inhibition pharmacologique du CFTR. L'utilisation d'une concentration de 10⁻⁷M de 1,25(OH)₂D₃ provoque une diminution légèrement supérieure (49%) de la phosphorylation de p38MAPK, comparativement aux cellules qui n'ont pas été traitées par la 1,25(OH)₂D₃. Bien que nous observons une tendance, ces diminutions ne diffèrent pas significativement de celles observées chez les cellules non-traitées à la 1,25(OH)₂D₃ (**Figure 17C**).

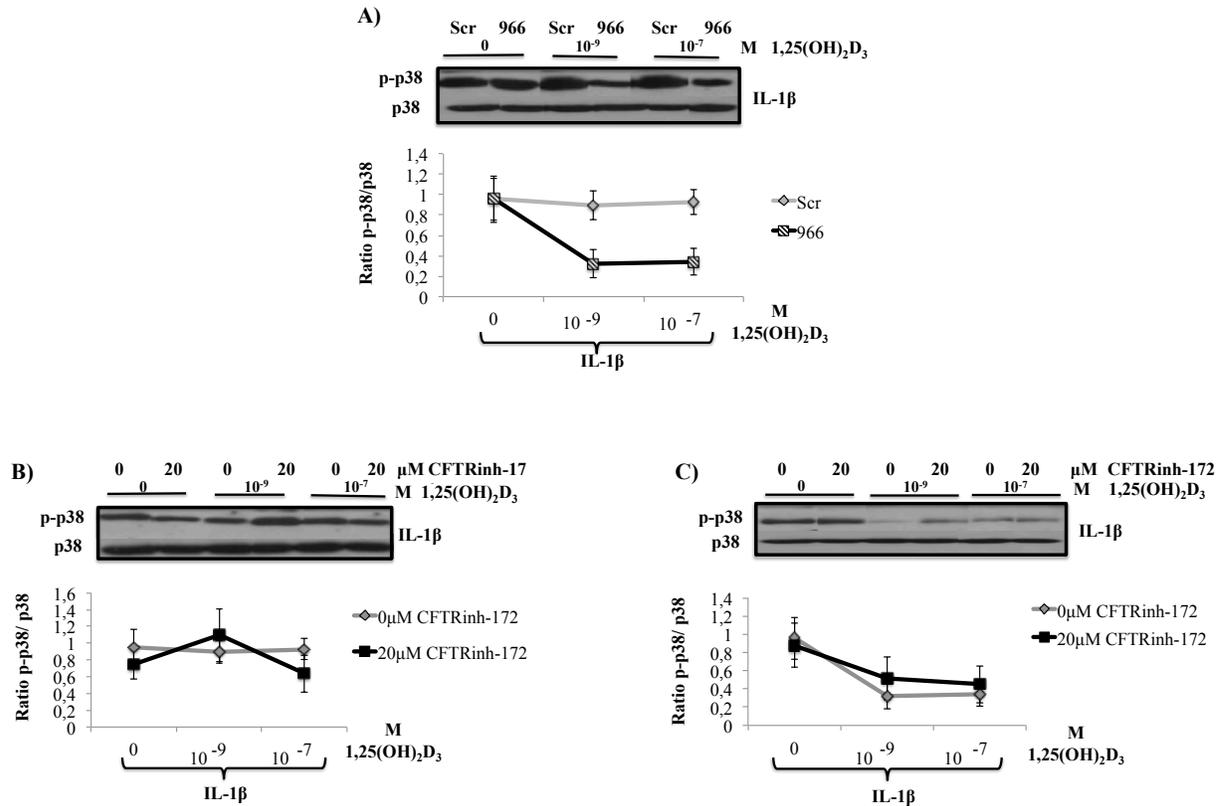


Figure 17. Effet de la 1,25 (OH)₂D₃ sur la phosphorylation de p38MAPK suite à la modification du CFTR des Caco-2/15. Les cellules Caco-2/15 ont été traitées par la 1,25(OH)₂D₃ pendant 24 heures et stimulées par l'IL-1 β pendant 30 minutes. L'expression protéique de la forme phosphorylée et totale de p38MAPK a été déterminée par Western Blot sur les Caco-2/15 dont le CFTR a subi une (A) invalidation génique; (B) inhibition pharmacologique ou (C) la combinaison des deux. Les résultats sont exprimés en ratio de l'expression de la forme phosphorylée de p38MAPK sur son expression totale. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences distinctes. Les comparaisons de moyennes ont été réalisées par analyse de variance suivie d'un test posthoc de Tukey pour les comparaisons deux à deux. Tous les résultats sont non-significatifs (NS).

En résumé ces expériences nous démontrent que la 1,25(OH)₂D₃ tend à réduire la phosphorylation de p38MAPK des Caco-2/15 ayant subi à la fois l'invalidation génique du CFTR couplée ou non à son inhibition pharmacologique.

d) Inhibition de la phosphorylation de p38MAPK

Afin de confirmer que l'effet anti-inflammatoire de la vitamine D passe par la modulation de la phosphorylation de p38MAPK, nous avons inhibé pharmacologiquement cette voie avec BIRB796, un inhibiteur spécifique de la phosphorylation de p38MAPK. Ainsi, si l'action de la vitamine D passe par la voie de p38MAPK, l'inhibition de celle-ci devrait abolir l'effet de la vitamine D sur la sécrétion d'IL-8.

La **Figure 18A** illustre une courbe dose-réponse de BIRB796 qui démontre une diminution puis une disparition complète de la phosphorylation de p38MAPK avec des concentrations croissantes de BIRB796. Avec une concentration de 1 μ M de BIRB796, on observe une inhibition partielle de 47% de la phosphorylation de p38MAPK alors que l'inhibition totale survient avec 10 μ M de BIRB796. Nous avons donc opté pour ces deux concentrations de BIRB 796 pour les expériences ultérieures. Nous avons également vérifié que l'utilisation de BIRB796 n'affectait pas la viabilité cellulaire aux concentrations sélectionnées. Le test de cytotoxicité MTT a été utilisé et nous montre que BIRB796 (1 μ M et 10 μ M) n'a aucun effet cytotoxique après 30 minutes d'incubation (**Figure 18B et C**).

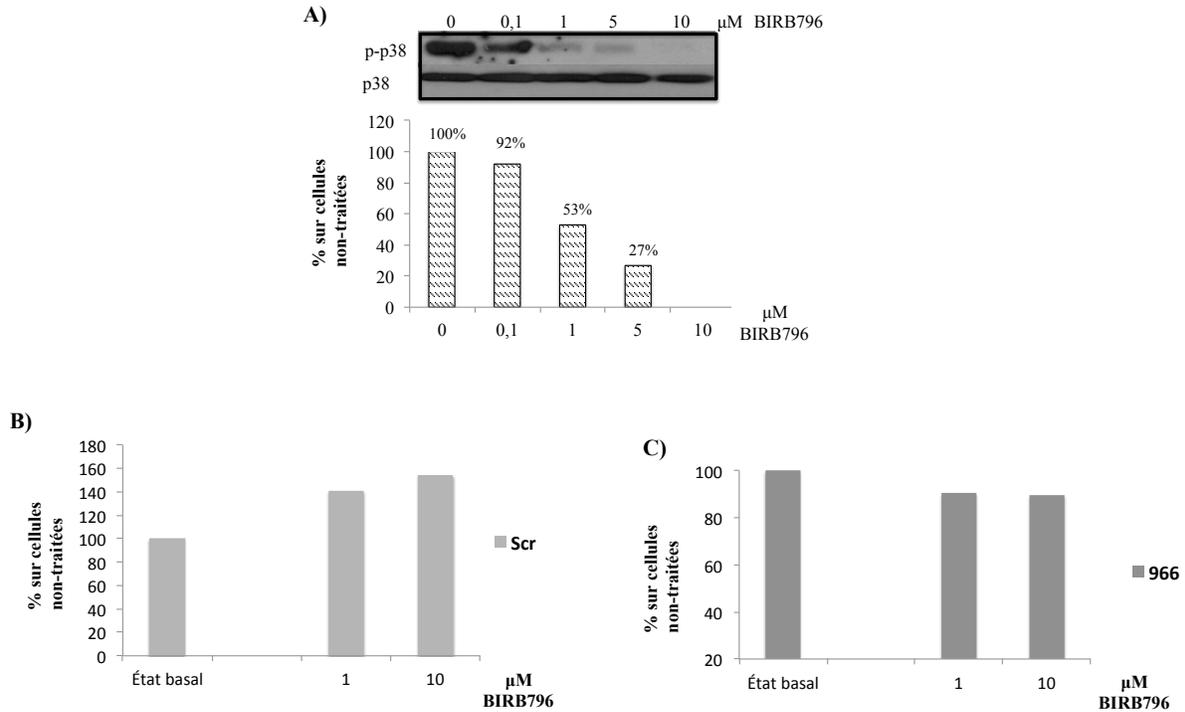


Figure 18. (A) Courbe dose-réponse de BIRB796 sur la phosphorylation de p38MAPK au sein de cellules Caco-2/15. Les cellules ont été pré-traitées avec le BIRB796 pendant 30 minutes puis avec 25ng/mL d'IL-1 β pendant 60 minutes. Les niveaux protéiques de phosphop38MAPK et de p38MAPK total ont été déterminés par Western blot et le ratio de la forme phosphorylée sur la forme totale calculé. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules Caco-2/15 non-traitées au BIRB796, mais incubées 60 minutes avec l'IL-1 β . Cette expérience a été réalisée une fois. (B-C) Test de MTT avec BIRB796 (1 μM et 10 μM) pour la viabilité cellulaire. Les cellules ont été pré-traitées avec le BIRB796 pendant 30 minutes avant d'ajouter l'IL-1 β à une concentration de 25ng/mL pour une durée de 24 heures. Les valeurs sont exprimées en % par rapport aux cellules non-traitées au BIRB796, mais incubées 60 minutes avec l'IL-1 β . Cette expérience a été réalisée une fois.

Tout d'abord, nous observons très peu d'effet de l'inhibiteur BIRB796 sur la sécrétion d'IL-8. En effet, l'inhibition complète de la phosphorylation de p38MAPK n'entraîne qu'une faible diminution de la sécrétion d'IL-8 à l'exception des cellules traitées avec 20 μ M de CFTRinh-172 (**Figure 19A et B**).

D'autre part, l'ajout de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ n'exerce aucun effet additionnel sur la sécrétion d'IL-8 de cellules ayant été traitées avec la dose la plus élevée de BIRB796. Par contre, un traitement à la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ tend à réduire la sécrétion d'IL-8 au sein des cellules ayant été traitées avec une concentration de 1 μ M de BIRB796. Seules les cellules ayant été invalidées génétiquement et inhibées avec une dose de 5 μ M de CFTRinh-172 démontrent une réduction significative de la sécrétion d'IL-8 en présence de 10 $^{-7}$ M de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (**Figure 19C**).

Cette série d'expériences suggère que 1) la sécrétion d'IL-8 des cellules Caco-2/15 ne dépend pas uniquement de la voie p38MAPK et que 2) la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ semble agir via la voie de p38MAPK puisque l'inhibition partielle de celle-ci n'empêche pas l'effet de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ sur la sécrétion d'IL-8 alors que son inhibition complète, neutralise complètement l'action de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$.

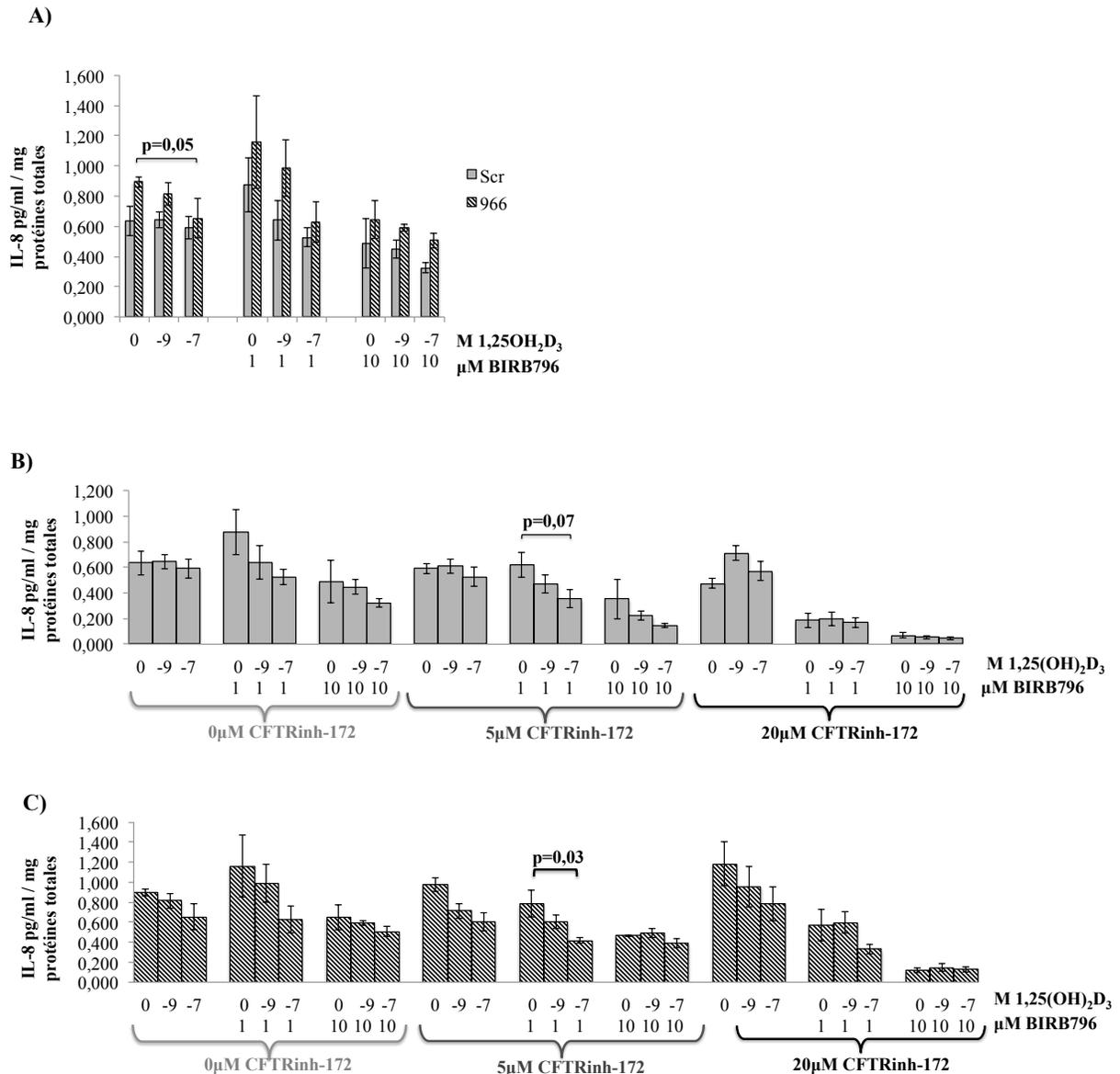


Figure 19. Effet de l'inhibiteur BIRB796 sur la sécrétion d'IL-8 en réponse à l'IL-1 β des cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été manipulé. Les Caco-2/15 ont été pré-incubées pendant 30 minutes avec le BIRB796 avant d'ajouter l'IL-1 β à une concentration de 25ng/mL pour une durée de 24 heures en présence ou non de 1,25(OH) $_2$ D $_3$. La sécrétion d'IL-8 a par la suite été mesurée par ELISA dans les surnageants. **A)** Invalidation génique du CFTR ; **B)** inhibition pharmacologique du CFTR, ou **C)** combinaison des deux. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 4 à 9 expériences distinctes. Les comparaisons de moyennes ont été réalisées par analyse de variance suivie d'un test posthoc de Tukey pour les comparaisons deux à deux.

e) Expression et niveau de la phosphatase-1 MAPK (MKP-1)

MKP-1 est une phosphatase qui déphosphoryle les MAPK, incluant p38MAPK, ce qui conduit à l'inhibition ou la réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires afin d'éviter les réactions inflammatoires excessives (125). De plus, selon une récente étude, il semblerait que la vitamine D inhiberait la production de cytokines pro-inflammatoires par l'induction de l'expression de MKP-1 via l'atténuation de l'activation de la voie p38MAPK (89).

Or, nous avons observé à la **Figure 17** que le niveau de phosphorylation de p38MAPK tend à diminuer suite au traitement à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ des cellules invalidées génétiquement pour le CFTR. Nous avons donc décidé d'évaluer l'expression de MKP-1 de nos cellules en réponse à un traitement à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La **Figure 20** nous montre qu'il n'y a aucun effet significatif de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur l'expression de la MKP-1 entre les cellules dont le CFTR a été invalidé et/ou inhibé et les cellules contrôles. Cependant, à la **Figure 20C** seules les cellules ayant été invalidées génétiquement et inhibées avec une dose de $20\mu\text{M}$ de CFTRinh-172 démontrent une petite réduction, par contre non-significative, du ratio de l'expression de MKP-1 sur la β -actine en absence de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de même qu'en présence de 10^{-9}M de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

En résumé, ces expériences nous suggèrent que l'effet inhibiteur de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur la phosphorylation de p38MAPK n'est pas causé par l'induction de l'expression de la phosphatase MKP-1.

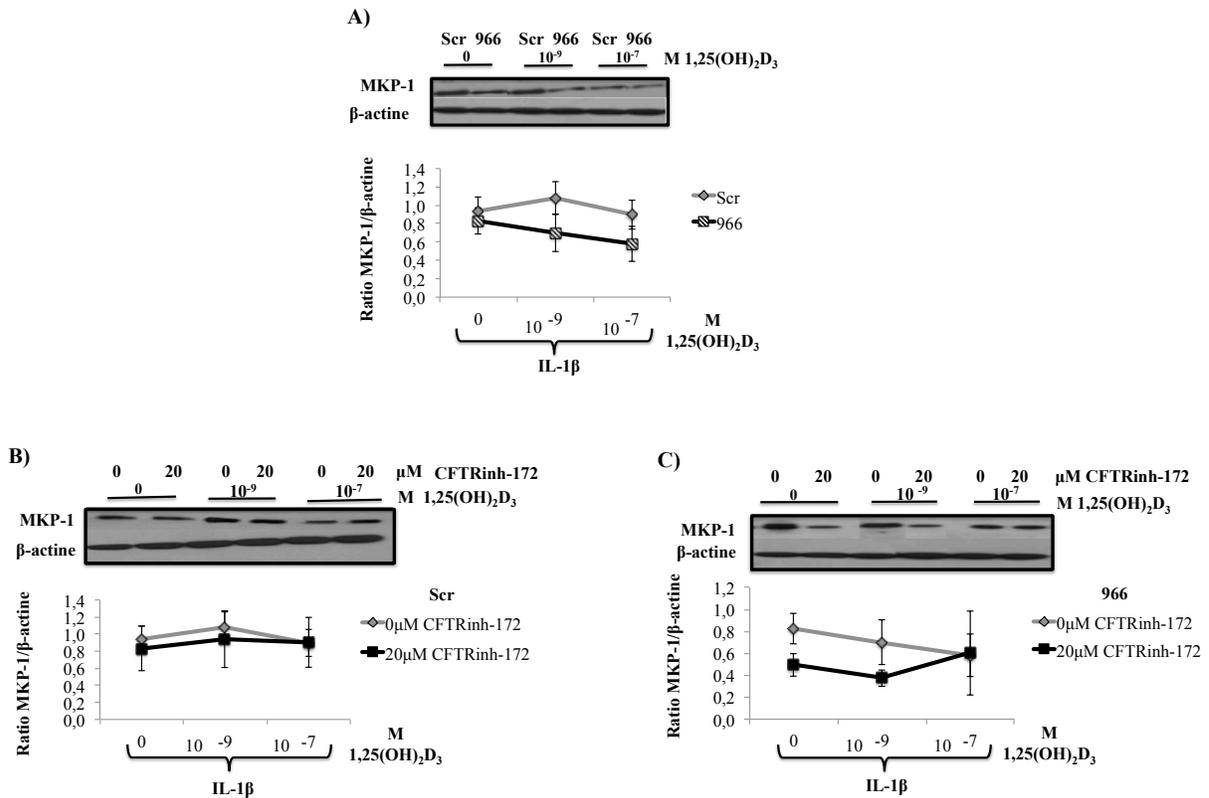


Figure 20. Effet de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur l'expression de MKP-1 suite à la modification du CFTR des Caco-2/15. Les cellules Caco-2/15 ont été traitées par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pendant 24 heures et stimulées par l'IL-1 β pendant 30 minutes. L'expression protéique de MKP-1 a été déterminée par Western Blot sur les Caco-2/15 dont le CFTR a été **(A)** invalidé génétiquement (construction 966); **(B)** inhibé pharmacologiquement (20 μM) ou **(C)** la combinaison des deux. Les résultats sont exprimés en ratio de l'expression de MKP-1 sur la β -actine. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences distinctes. Les comparaisons de moyennes ont été réalisées par analyse de variance. Tous les résultats sont non-significatifs (NS).

f) Niveau de phosphorylation du facteur de transcription NFκB

Afin d'explorer plus en détail les mécanismes anti-inflammatoires de la vitamine D, nous avons investigué l'effet de la forme bioactive de la vitamine D sur le niveau de phosphorylation de NFκB des cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été déplété ou non génétiquement. Il a été préalablement démontré que la 1,25 (OH)₂D₃ stimule l'augmentation de IκB afin d'inhiber l'activation de NFκB (86).

La **Figure 21** nous démontre qu'à l'état basal, en absence d'un inducteur inflammatoire, la 1,25 (OH)₂D₃ ne semble pas agir sur le niveau de phosphorylation de NFκB, autant sur les Caco-2/15 dont le CFTR est invalidé génétiquement (966) que sur les cellules dont le CFTR est intact (Scr). Face à l'inducteur IL-1β, l'ajout de 1,25(OH)₂D₃ à une concentration de 10⁻⁹M et 10⁻⁷M provoque une légère diminution du niveau de phosphorylation de NFκB comparativement aux cellules non-traitées à la 1,25(OH)₂D₃. Cet effet est observable chez les cellules invalidées et Scr. Avec cette technique qualitative et ses limites inhérentes, il est par contre difficile de conclure en une différence de phosphorylation entre les cellules invalidées et Scr.

En résumé, la vitamine D semble provoquer une diminution du niveau de phosphorylation de NFκB sur les cellules dont le CFTR est invalidé génétiquement (966) ou non.

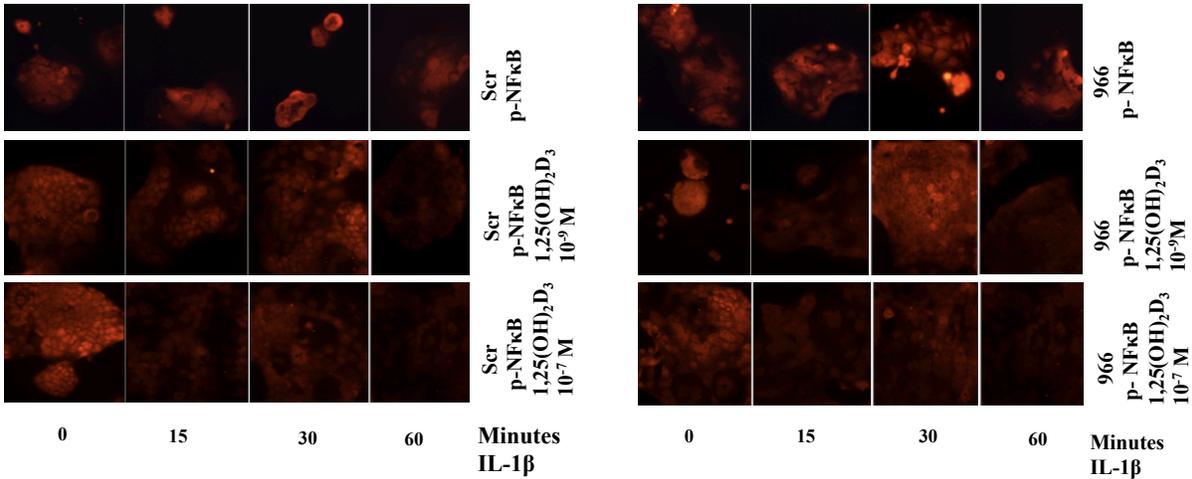


Figure 21. Effet de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur l'expression de la forme phosphorylée du facteur de transcription NF κ B. L'expression de NF κ B a été visualisée par immunofluorescence sur les Caco-2/15 traitées par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pendant 24 heures suivi d'une stimulation par IL-1 β (25ng/ml) pendant 15, 30 ou 60 minutes. Les cellules récoltées au temps 0 n'ont pas été exposées à l'IL-1 β . Les cellules infectées avec le lentivirus renfermant la séquence aléatoire *Scrambled* (Scr) ont servi de contrôle négatif. Les cellules 966 sont celles dont le CFTR est invalidé génétiquement. Les images montrées sont représentatives d'une expérience qui a été répétée 4 fois.

g) Expression du récepteur nucléaire de la vitamine D et des hydroxylases intestinales impliquées dans son métabolisme

Nous avons finalement postulé que l'effet anti-inflammatoire de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pouvait provenir d'une modulation de sa synthèse, de son catabolisme ou de son activité qui survient suite à la manipulation du CFTR intestinal ou à l'induction de l'inflammation. Pour vérifier cette hypothèse, l'expression génique des hydroxylases intestinales qui assurent la dégradation de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (CYP24) et sa synthèse (CYP27B1) de même que son récepteur nucléaire (VDR) a été évaluée par RT-PCR.

1. CYP24

CYP24 est une hydroxylase responsable du catabolisme de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. L'expression intestinale de cet enzyme a été préalablement démontrée (126). Une altération de son expression pourrait donc modifier la biodisponibilité cellulaire de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Le gène de CYP24 n'est induit qu'en présence de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, c'est la raison pour laquelle seules les cellules traitées à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sont présentées à la **Figure 22**.

Expression à l'état basal

L'expression de CYP24 ne diffère pas entre les cellules invalidées génétiquement pour le CFTR (966) et les cellules contrôles (Scr) bien que les cellules 966 tendent à exprimer plus faiblement CYP24 que les cellules Scr et ce, en présence de doses croissantes de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, (**Figure 22A**). Ces observations ne sont toutefois pas significatives d'un point de vue statistique. L'inhibition pharmacologique de la fonction du CFTR selon des doses croissantes du CFTRinh-172 (5 et $20\mu\text{M}$) entraîne une diminution significative de l'expression de CYP24 et ce, peu importe la concentration de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ employée (**Figure 22B**). La combinaison de l'invalidation génique et de l'inhibition pharmacologique exerce peu d'effet sur l'expression basale de CYP24 à faible concentration de l'inhibiteur ($5\mu\text{M}$). Par contre, une concentration de $20\mu\text{M}$ du CFTRinh-172 entraîne une diminution significative de l'expression de CYP24 et ce, lorsque les cellules sont traitées par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ à une dose de 10^{-7}M (**Figure 22C**).

Expression suite à un traitement pro-inflammatoire

Comparativement à l'état basal, l'ajout d'IL-1 β (25ng/ml) n'entraîne aucune différence significative quant à l'expression de CYP24 des cellules dont le CFTR a été manipulé génétiquement et/ou inhibé pharmacologiquement (**Figure 22**).

Les résultats précédents laissent croire que le métabolisme intestinal et la biodisponibilité de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ pourraient être atténués lors de la manipulation du CFTR. Une diminution de l'expression de CYP24 aurait pour conséquence une diminution du catabolisme de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ et conséquemment, une augmentation de son niveau intracellulaire, ce qui peut

venir expliquer pourquoi la 1,25(OH)₂D₃ exerce un effet anti-inflammatoire chez la cellule Caco-2/15 dont le CFTR est manipulé mais non chez la cellule Caco-2/15 ayant un CFTR intact.

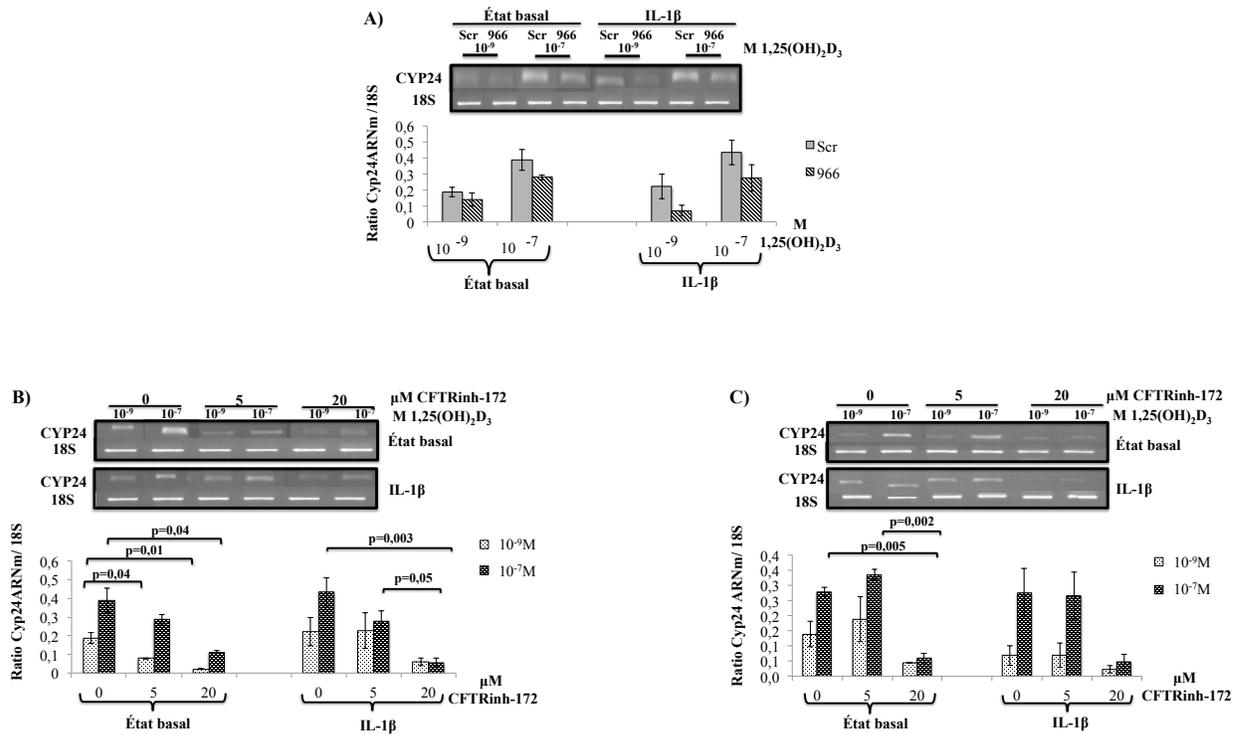


Figure 22. Expression génique de CYP24 des Caco-2/15 dont le CFTR a été modifié. Les Caco-2/15 ont été traitées par la 1,25 (OH)₂D₃ aux concentrations indiquées pendant 24 heures et stimulés ou non (état basal) par l’agent inducteur pro-inflammatoire, IL-1 β , à une concentration de 25 ng/ml pendant 8 heures. Suite à l’extraction des ARN totaux, l’expression de CYP24 a été déterminée par RT-PCR. Niveau d’expression d’ARNm de CYP24 des Caco-2/15 dont le CFTR a été **(A)** invalidé génétiquement (construction 966) ; **(B)** inhibé pharmacologiquement et **(C)** la combinaison des deux. Les résultats d’expression génique ont été normalisés en fonction de l’expression de l’ARN ribosomal 18S. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences distinctes. Les comparaisons de moyennes ont été réalisées par un test t de Student ou une analyse de variance suivie d’un test posthoc de Tukey pour les comparaisons deux à deux.

2- CYP27B1

CYP27B1 est un gène qui code pour l'enzyme 1α -hydroxylase. Cet enzyme assure la synthèse de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, la forme bioactive de la vitamine D. Il a été préalablement démontré que cet enzyme est exprimé au niveau intestinal (127). Plusieurs maladies inflammatoires sont associées à des changements dans l'expression du gène CYP27B1. Ainsi, une altération de son expression pourrait avoir un impact sur l'action intestinale de la vitamine D (128).

Tel qu'illustré à la **Figure 23**, nous ne constatons aucun effet significatif de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur l'expression génique de la CYP27B1 sur les cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été invalidé et/ou inhibé et ce, en présence ou non de l'agent pro-inflammatoire l'IL- 1β (25ng/ml).

Ces résultats suggèrent que l'expression génique de CYP27B1 n'est ni modulé par l'invalidation génique et/ou l'inhibition pharmacologique du CFTR ni par l'ajout de la cytokine pro-inflammatoire, IL- 1β .

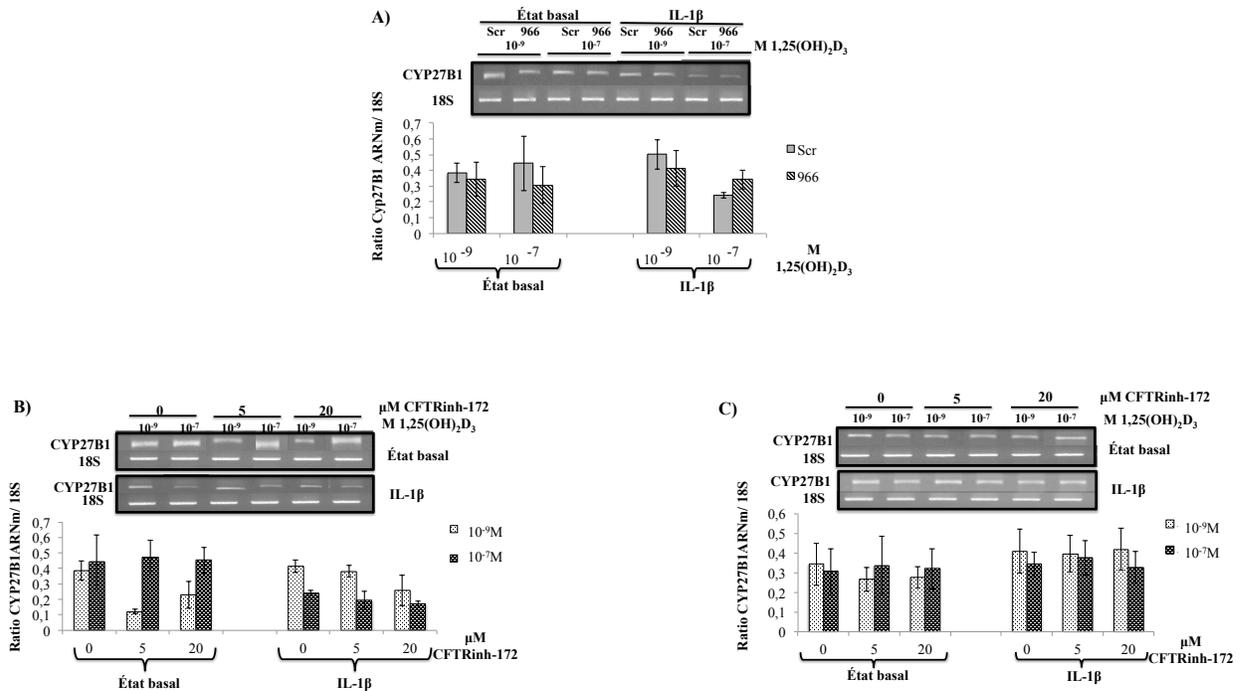


Figure 23. Expression génique de CYP27B1 des Caco-2/15 dont le CFTR a été modifié. Les Caco-2/15 ont été traitées par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aux concentrations indiquées pendant 24 heures et stimulées par l'agent inducteur pro-inflammatoire, IL-1 β , selon une concentration de 25 ng/ml pendant 8 heures. Suite à l'extraction des ARN totaux, l'expression de CYP27B1 a été déterminée par RT-PCR. Niveau d'expression d'ARNm de CYP27B1 des Caco-2/15 dont le CFTR a été (A) invalidé génétiquement (construction 966); (B) inhibé pharmacologiquement ou (C) la combinaison des deux. Les résultats d'expression génique ont été normalisés en fonction de l'expression de l'ARN ribosomal 18S. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences distinctes. Les comparaisons de moyennes ont été réalisées par un test t de Student ou une analyse de variance. Tous les résultats sont non-significatifs (NS).

3-Récepteur nucléaire de la vitamine D (VDR)

Le VDR est un récepteur appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires, qui regroupe notamment les récepteurs aux estrogènes, aux hormones thyroïdiennes, à l'acide rétinoïque ainsi qu'à la forme active de la vitamine D, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Plusieurs tissus expriment le VDR dont, entre autres, le tissu intestinal (129). Dans la cellule, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se lie au VDR. Le complexe VDR- $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se dirige vers le noyau de la cellule où il s'associe au

RXR. Le complexe RXR-VDR-1,25(OH)₂D se lie à l'intérieur du noyau, à l'ADN sur des sites appelés « éléments de réponse à la vitamine D » (VDRE), situé en amont du gène dont l'expression est soit activée ou réprimée, ce qui module subséquemment la synthèse de nombreuses protéines (130). Il a été montré qu'une altération de l'expression du gène VDR intestinal induit des changements phénotypiques pouvant causer une inflammation intestinale (129). Un changement dans l'expression du VDR pourrait également avoir un impact sur le métabolisme de la 1,25(OH)₂D₃ au niveau intestinal en altérant l'action de celle-ci (96).

Nos résultats suggèrent que l'expression génique du VDR n'est pas altérée par la manipulation du CFTR et ce, en présence ou non d'IL-1β (**Figure 24**). Par contre, l'induction d'un état inflammatoire entraîne une baisse significative de l'expression du VDR dans certaines conditions. En effet, indépendamment du statut du CFTR, l'ajout d'IL-1β en présence de 10⁻⁷M de 1,25 (OH)₂D₃ cause une diminution marquée de l'expression génique du VDR.

En résumé, les résultats nous démontrent que l'expression génique du VDR n'est pas altérée par l'invalidation génique et/ou l'inhibition pharmacologique du CFTR des cellules Caco-2/15 et ce, en situation d'inflammation ou non. Par contre, la présence concomitante d'IL-1β et de 10⁻⁷M de 1,25 (OH)₂D₃ semble exercer un effet répressur sur l'expression du VDR des cellules Caco-2/15.

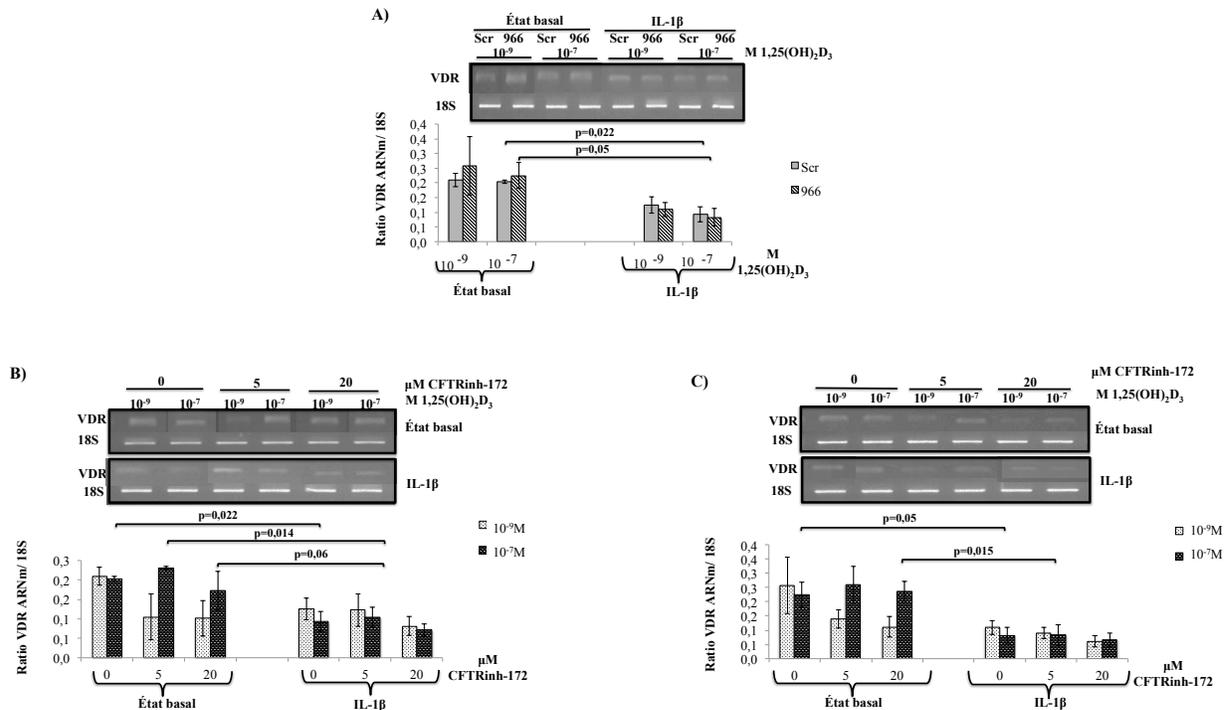


Figure 24. Expression génique du VDR dans les cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été modifié. Les Caco-2/15 ont été traitées par la 1,25 (OH)₂D₃ aux concentrations indiquées pendant 24 heures et stimulées par l'agent inducteur pro-inflammatoire, IL-1β, à une concentration de 25 ng/ml pendant 8 heures. Suite à l'extraction des ARN totaux, l'expression de VDR a été déterminée par RT-PCR. Niveau d'expression d'ARNm du VDR des Caco-2/15 dont le CFTR a été (A) invalidé génétiquement (construction 966); (B) inhibé pharmacologiquement ou (C) la combinaison des deux. Les résultats d'expression génique ont été normalisés en fonction de l'expression de l'ARN ribosomal 18S. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de 4 expériences distinctes. Les comparaisons de moyennes ont été réalisées par analyse de variance ou test t de Student le cas échéant.

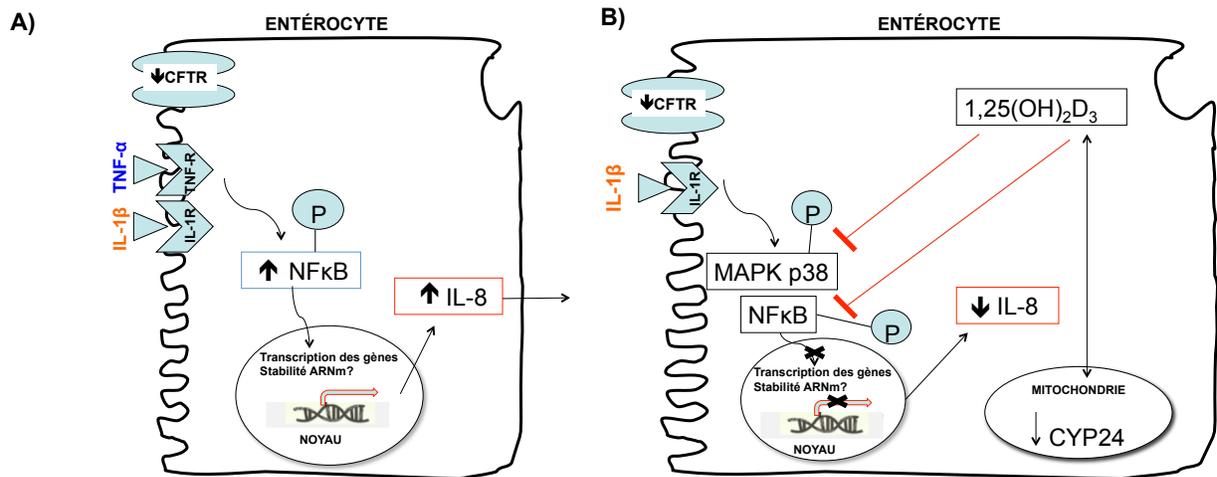


Figure 25. Schémas récapitulants les principaux résultats de l'étude. **A)** Impact de l'inactivation génétique du CFTR de la cellule intestinal Caco-2/15. Une réduction de l'expression protéique du CFTR de 39% a entraîné une augmentation significative de la sécrétion d'IL-8 en réponse à deux agents pro-inflammatoires soit le TNF- α et l'IL-1 β . Cet effet serait médié par une augmentation de la phosphorylation de NF κ B. **B)** Impact d'un traitement à la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ sur les cellules Caco-2/15 invalidées pour le CFTR. La présence de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ a causé une diminution de la sécrétion d'IL-8 en réponse à l'inducteur pro-inflammatoire IL-1 β . Cet effet serait médié par une diminution de la phosphorylation de p38MAPK et de NF κ B en réponse à la 1,25(OH) $_2$ D $_3$. Une baisse de l'expression du cytochrome CYP24 responsable du catabolisme de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ a également été observée au sein des cellules invalidées. Ceci pourrait permettre une action prolongée de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ et ainsi expliquer pourquoi l'effet de la vitamine n'est observé que chez les cellules invalidées et non dans les cellules contrôles.

CHAPITRE 5. Discussion

Ce projet de maîtrise comportait deux volets. Dans un premier temps, il avait pour objectif de déterminer si la manipulation du CFTR a un impact sur le statut inflammatoire de la cellule intestinale Caco-2/15. Dans un deuxième temps, il visait à investiguer si la vitamine D exerce des actions anti-inflammatoires au niveau intestinal et ce, dans un modèle cellulaire reproduisant un contexte de FK.

5.1 Modèle cellulaire Caco-2/15

Les cellules Caco-2/15 représentent un modèle expérimental reconnu pour étudier l'absorption des nutriments. De plus, ces cellules issues d'un adénocarcinome colorectal humain représentent un excellent modèle pour répondre à nos objectifs puisqu'elles ont la particularité de former des jonctions serrées, de se différencier et d'acquérir toutes les propriétés physiologiques de l'intestin grêle. Elles exhibent les caractéristiques d'entérocytes matures incluant la présence de microvillosités sur la bordure en brosse et expriment les enzymes digestives (113, 131, 132). De plus, elles expriment des canaux ioniques qui assurent le transport des électrolytes et présentent des caractéristiques électrophysiologiques. Ainsi, à l'état basal, la membrane apicale des Caco-2 possède un potentiel électrique membranaire (V_m) d'environ -20mV. La baisse de ce potentiel va favoriser l'influx et le transport à travers cette membrane tout en augmentant la perméabilité à des ions comme K^+ et/ou Na^+ . La baisse du potentiel électrique membranaire et le plus souvent due à des agents qui affectent les jonctions serrées de l'épithélium (133).

Comme la FK est une maladie qui touche particulièrement l'intestin, nous avons utilisé ce modèle pour procéder à l'inactivation génique du CFTR et ainsi étudier les conséquences pathophysiologiques de cette manipulation. D'après la **Figure 9**, nous avons obtenu une réduction significative de l'expression génique du CFTR de 52% dans les cellules infectées avec les shRNAis dirigés contre le CFTR par rapport aux cellules infectées avec le lentivirus renfermant la séquence Scr. De plus, cette déplétion génique du CFTR a induit une déplétion protéique de 39% du CFTR. Cependant, pour corroborer les résultats obtenus avec cette

technique, nous avons également choisi de traiter les cellules avec des doses croissantes d'un inhibiteur spécifique du CFTR (CFTRinh-172) pendant 72 heures. Ce produit est connu pour inhiber la conductivité du canal chlorure et nous a permis de comparer les effets de l'absence du gène du CFTR à ceux causés par un CFTR dysfonctionnel.

Deux études antérieures de Mailhot *et al.* visant à explorer le rôle du CFTR dans le métabolisme lipidique intestinal, ont également utilisé la méthode d'infection par lentivirus à l'aide de shRNAs dirigés contre le CFTR dans les Caco-2/15. Dans ces études, ils ont obtenu une invalidation génique du CFTR se situant entre 60 et 70 % et une diminution de l'expression protéique variant entre 50-57 % comparée aux cellules témoins (118, 119).

Puisque les mêmes vecteurs et plasmides ont été utilisés dans notre étude, nous attribuons les différences d'expression à certains facteurs d'ordre technique dont la variabilité entre les préparations cellulaires et l'utilisation de différentes membranes (nitrocellulose vs PVDF) lors du Western Blot. De plus, les études de Mailhot *et al.* ont été réalisées sur des cellules Caco-2/15 ayant subi une différenciation de 10 à 14 jours alors que nous avons utilisé des cellules en phase proliférative.

Il est important de soulever le fait que notre déplétion protéique n'est que partielle et que conséquemment un courant résiduel non négligeable pourrait être présent dans les cellules avec invalidation, contrairement à l'épithélium intestinal FK où il ne reste pas ou très peu d'activité résiduelle du CFTR. Ainsi, notre modèle n'est pas parfait mais pourrait permettre, à tout le moins, de reproduire une situation retrouvée chez les porteurs hétérozygotes de mutations du CFTR.

Il est aussi important de mentionner que les lentivirus n'ont provoqué aucune toxicité sur les cellules Caco-2/15. Il a été démontré que la viabilité, l'intégrité et la différenciation cellulaire ne sont pas altérées par la manipulation génique et protéique du CFTR. De plus, aucun changement n'a été observé suite à l'évaluation de l'expression protéique des marqueurs de différenciation tels que la villine et la sucrase (118, 119).

Il a été rapporté que les patients atteints de FK présentent une réaction inflammatoire exagérément élevée au sein de plusieurs organes et cellules qui pourrait être attribuable au CFTR dysfonctionnel (110). Le but du premier volet de cette étude était donc de (i) déterminer si la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire l'IL-8 était augmentée dans les cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été invalidée génétiquement et/ou inhibé pharmacologiquement et (ii) explorer les mécanismes sous-jacents à cette réponse inflammatoire exagérée.

5.2 Manipulation du CFTR et profil inflammatoire de la cellule Caco-2/15

a) Sécrétion d'interleukine-8

Les résultats de la **Figure 10** suggèrent que la déplétion génique du CFTR affecte la réponse de la cellule à non pas un mais deux agents pro-inflammatoires. Ce résultat suggère que son effet ne cible pas spécifiquement la voie du TNF- α ou celle de l'IL-1 β mais qu'il cible des voies/molécules communes à ces deux cytokines. D'ailleurs, cette hausse de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire l'IL-8 est observée seulement chez les cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été invalidé génétiquement. Aucune augmentation de la sécrétion d'IL-8 n'est observée lorsque le CFTR des Caco-2/15 a été inhibé pharmacologiquement. Ces résultats peuvent notamment être dus au fait que nous n'avons pas vérifié au préalable si l'inhibiteur inhibe bel et bien le courant chlorure dans notre modèle cellulaire intestinal. En effet, les traitements avec la forskoline et l'IBMX, deux composés connus pour activer le CFTR, ont considérablement réduit la sécrétion d'IL-8 dans les cellules Caco-2/15, indiquant que l'activation du canal CFTR peut être nécessaire pour atténuer la réponse inflammatoire. Par contre, il est important de préciser que la forskoline et l'IBMX permettent une élévation de la concentration intracellulaire d'AMPc. Bien que ce second messager est impliqué dans l'activation du CFTR, il module également d'autres voies de signalisation et canaux ioniques qui peuvent expliquer le résultat observé.

La sélection des doses d'inhibiteur utilisées dans le présent projet a été faite à partir d'une étude réalisée sur un modèle cellulaire des voies respiratoires. Dans cette étude, Perez *et al.* (115) démontrent une augmentation de la sécrétion de l'IL-8, suite au traitement avec le CFTRinh-172, dans des cellules épithéliales humaines trachéale et bronchiale et ce, après stimulation avec des agents pro-inflammatoires tels que le TNF- α /IL-1 β .

L'absence d'effet du CFTRinh-172 au sein de notre modèle cellulaire peut aussi être expliquée par le fait qu'il s'agit d'un type cellulaire fort distinct des cellules des voies respiratoires en termes de canaux ioniques. L'inhibition du CFTR peut rapidement être compensée par l'activation d'un ou de plusieurs autres canaux ioniques, dont le canal Cl⁻ activé par le calcium (134). De plus, il est possible que l'effet de l'inhibiteur soit instable et qu'après 24 heures, il soit dégradé ou ait perdu de son efficacité. L'alternative aurait été d'ajouter des concentrations plus élevées de CFTRinh-172 ou de réaliser des traitements répétés plus courts (i.e aux 6 heures). Par contre, ceci aurait pu se faire au détriment d'une réduction de la viabilité cellulaire. Finalement, la spécificité de cet inhibiteur est également questionnable puisque Kelly *et al.* ont démontré que le CFTRinh-172 avait des effets sur la fonction mitochondriale qui sont indépendants de son action sur le CFTR (135). Ainsi, certains de ces effets pourraient expliquer quelques-uns de nos résultats tels que discutés plus loin.

La sécrétion d'IL-8 est particulièrement étudiée au sein des modèles cellulaires respiratoires car elle y joue un rôle chimio-attractant permettant de recruter les neutrophiles aux sites d'inflammation (136). Les niveaux d'IL-8 ont été trouvés très élevés dans les voies respiratoires des patients atteints de FK (137). La sécrétion d'IL-8 est également étudiée au sein des modèles cellulaires intestinaux. Les cellules épithéliales qui tapissent la surface de la muqueuse de l'intestin forment une barrière protectrice contre les agents pathogènes. Ces cellules semblent être une composante très importante du système immunitaire intestinal. L'exposition des cellules épithéliales intestinales au TNF- α / IL-1 β , sécrétés par les cellules immunitaires avoisinantes, cause l'accroissement de leur production d'IL-8. Ce système de signalisation précoce est important pour l'initiation et l'amplification de la réponse inflammatoire de la muqueuse intestinale et ce, même dans les premiers stades de l'infection bactérienne, après pénétration de la barrière épithéliale par des agents pathogènes (11, 138).

Ainsi, si la réponse inflammatoire intestinale est exagérée lors de déplétion du CFTR, tel que semble l'indiquer nos résultats, nous pouvons spéculer que ceci peut contribuer à initier ou amplifier l'inflammation intestinale chronique dont souffrent ces patients.

b) Expression génique d'IL-8

Dans notre quête des mécanismes sous-jacents à cette augmentation de la sécrétion d'IL-8, nous avons émis l'hypothèse que son expression génique serait également modulée à la hausse chez les cellules dont le CFTR est manipulé. Il a d'ailleurs été démontré que les agents inducteurs tels que le TNF- α et IL-1 β augmentent rapidement l'expression génique d'IL-8 dans les cellules épithéliales intestinales (122).

Les résultats obtenus, nous confirment que l'expression génique d'IL-8 est bien induite par l'ajout d'un inducteur pro-inflammatoire. Par contre, dans notre étude nous remarquons l'absence de différence significative au niveau de l'expression basale ou stimulée de l'IL-8 entre les cellules dont le CFTR a été invalidé et/ou inhibé et les cellules contrôles. Saadane *et al.* ont observé une augmentation de l'expression génique d'IL-8 induite par l'ajout d'un inducteur pro-inflammatoire, dont le TNF- α ou IL-1 β et ce, après seulement 3 heures de stimulation. Par contre, après 6 heures, ils ont constaté une diminution de l'expression génique d'IL-8 (139). Ainsi, une stimulation d'une durée de 8 heures pourrait être trop longue et donc expliquer l'absence de différence significative observée.

L'augmentation de la sécrétion d'IL-8 observée lors de l'invalidation génique du CFTR des cellules Caco-2/15 n'est donc pas causée par un accroissement de son expression génique. Cette observation suggère que la régulation de la production d'IL-8 pourrait être post-transcriptionnelle ou post-translationnelle. En effet, Stoeckle a démontré dans un modèle de fibroblastes que la dégradation des ARNm de l'IL8 diminuait et les taux intracellulaires d'ARNm se stabilisaient en présence d'IL-1 β (140). De plus, Jijon *et al.* ont précisément examiné la stabilité de l'ARNm de l'IL-8 dans les cellules épithéliales intestinales. Ils ont confirmé que l'inhibition de la voie p38MAPK provoque une forte dégradation de l'ARNm de

l'IL-8, ce qui suggère que l'activation de p38MAPK contribue à la sécrétion de la cytokine IL-8 stimulée par TNF- α dans les cellules épithéliales intestinales par un mécanisme post-transcriptionnel qui implique la stabilisation de la transcription de l'IL-8 (122).

Certaines études ont été faites afin de regarder la stabilité de l'ARNm de l'IL-8 dans un contexte de FK. Balakathiresan *et al.* ont évalué la stabilité de l'ARNm de l'IL-8 de cellules épithéliales pulmonaires de patients FK après un traitement à l'actinomycine D. Les données indiquent que l'ARNm de l'IL-8 est dégradé plus lentement chez les cellules FK comparativement aux cellules contrôles, ce qui contribue à une plus forte expression du gène IL-8 dans les cellules épithéliales pulmonaires de FK (141). Une étude menée par Bhattacharyya *et al.* confirme que le mécanisme par lequel les mutations du CFTR causent une inflammation des voies respiratoires des patients FK peut être dû à un défaut de la régulation de la stabilité de l'ARNm de l'IL-8 médiée par l'activation des voies de signalisation des MAPKs (142). La stabilité de l'ARNm de l'IL-8 pourrait être vérifiée au sein de notre modèle en traitant nos cellules avec l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription de l'ADN en ARNm et en vérifiant subséquemment par PCR l'expression d'IL-8 afin d'en évaluer sa stabilité. Ces études sont présentement en cours dans le laboratoire.

c) Expression et niveau de phosphorylation de la voie p38MAPK

L'ajout de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α ou IL-1 β active des voies de signalisation cellulaire pro-inflammatoires situées en amont de la sécrétion d'IL-8. Nous avons donc postulé qu'une augmentation de l'activation et de l'expression de l'une de ces voies, la voie de p38MAPK, pourrait contribuer à la sécrétion plus élevée d'IL-8 observée chez les cellules invalidées génétiquement pour le CFTR.

L'ajout de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β augmente effectivement l'expression de la forme phosphorylée de p38MAPK comparativement aux cellules non-traitées. Par contre, les niveaux protéiques totaux de p38MAPK demeurent constants en présence de l'inducteur inflammatoire. Ceci prouve que l'augmentation de l'expression de p38MAPK phosphorylée

ne dérive pas d'une augmentation de l'expression protéique de la p38MAPK totale. Cependant, nos résultats nous indiquent que l'invalidation génique et/ou l'inhibition pharmacologique du CFTR n'exercent aucun impact sur les niveaux de phosphorylation de p38MAPK comparativement aux cellules contrôles. Nos résultats vont à l'encontre de l'étude faite par Bérubé *et al.* Selon leurs travaux, la phosphorylation de p38MAPK est augmentée dans les cellules ayant un CFTR dysfonctionnel, par rapport aux cellules exprimant le CFTR. Cependant, l'étude a été réalisée dans les cellules épithéliales des voies aériennes en présence d'agents pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa* (143). Cette différence de modèle expérimental peut expliquer la divergence des résultats entre notre étude et la leur.

De plus, Holtmann *et al.* ont montré que l'activation de la voie de p38MAPK contribue à l'induction de la synthèse de la cytokine IL-8 et ce, en stabilisant son ARNm (123). D'autres auteurs ont également suggéré que l'IL-1 β induisait l'expression génique d'IL-8 par l'activation de la voie p38MAPK qui agirait directement sur le promoteur d'IL8 dans les cellules Caco-2 (144). Bien que ces observations expliquent nos résultats soit l'augmentation de l'expression génique d'IL-8 et de la phosphorylation de la voie p38MAPK en réponse à l'IL-1 β , ces deux mécanismes n'expliquent pas pourquoi la sécrétion d'IL-8 est plus importante lors de l'invalidation génique du CFTR. L'absence d'effet sur p38MAPK n'exclut pas qu'il y ait des effets de la déplétion génique du CFTR sur d'autres voies de signalisation telles que celles de ERK ou JNK tel qu'observé par Saadane A *et al.* (139) En présence de la combinaison TNF α /IL-1 β , ils ont notamment observé une augmentation de la phosphorylation de ERK ainsi que de l'isoforme p54 et p46 de JNK dans les cellules épithéliales bronchiques donc l'expression du CFTR a été inhibée, comparativement aux cellules dont le CFTR est intact. Des études sur les voies de signalisation ERK et JNK sur les Caco-2/15 dont le CFTR a été manipulé sont présentement en cours dans le laboratoire.

d) Expression et niveau de phosphorylation du facteur de transcription NF κ B

NF κ B intervient dans l'activation de la transcription de plusieurs gènes qui sont impliqués dans l'inflammation des muqueuses intestinales. Ce qui suggère qu'il joue un rôle important

dans la pathogenèse des maladies inflammatoires de l'intestin (124). Dans la plupart des cellules, NFκB est un hétérodimère comprenant les sous-unités RelA (p65) et NFκB1 (p50). Lors de l'activation par divers stimuli, tels que les cytokines, les facteurs de croissance, les lymphocytes T mitogènes, le stress oxydatif, les bactéries ou les virus, NFκB régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans les réactions inflammatoires, y compris la chimiokine IL8 (145).

Dans la présente étude, nous avons donc exploré plus en détail les voies moléculaires responsables de l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 lors de l'inactivation génique du CFTR, en investiguant l'expression et le niveau de phosphorylation de NFκB des cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été déplété ou non génétiquement. Les résultats obtenus suggèrent une augmentation du niveau de phosphorylation de NFκB au sein des cellules invalidées. Les limites inhérentes à la technique employée nous empêchent toutefois de conclure avec certitude à cet effet. Les résultats obtenus suggèrent également que l'effet de l'IL-1β sur la phosphorylation de NFκB au sein des cellules déplétées génétiquement est indépendant de l'activation de p38MAPK. Ainsi, des expériences de Western Blot visant à quantifier les niveaux protéiques des formes totale et phosphorylée de NFκB au sein de nos différents modèles expérimentaux pourraient nous permettre de confirmer ces résultats.

D'ailleurs, plusieurs chercheurs croient que la dysfonction du CFTR provoque une augmentation du niveau de NFκB nucléaire causant une hausse de l'IL-8 à l'origine de l'inflammation pulmonaire chronique chez les FK (146, 147). Cette augmentation est notamment expliquée par l'augmentation du niveau de phosphorylation d'IκBα qui libère le NFκB cytoplasmique et lui permet de transloquer au noyau pour y exercer la régulation de l'expression de gènes-cibles. Sur un modèle de souris dont le CFTR est « *knockout* » (CFKO) le niveau de phosphorylation de IκBα est effectivement augmenté dans les poumons comparativement aux souris dont le CFTR est intact (148). Hunter *et al.* ont démontré que la transfection d'une lignée cellulaire pulmonaire n'exprimant pas le CFTR endogène avec des doses croissantes d'un plasmide porteur du CFTR diminuent l'activité de NFκB suggérant ainsi que le CFTR lui-même aurait des propriétés anti-inflammatoires ciblant NFκB. En effet, l'absence du CFTR au niveau de la membrane provoquerait une perturbation de multiples

voies de signalisation, puisque le CFTR contrôle la localisation de différentes protéines kinases qui sont impliqués dans la signalisation inflammatoire (149).

Vij *et al.* démontrent aussi que ce n'est pas seulement l'accumulation du CFTR mal replié dans le réticulum endoplasmique ou autre sous-produit de la mutation du CFTR qui mènent à la fonction anormale de la voie de signalisation de NF κ B. L'absence du CFTR dans les radeaux lipidiques pourrait être associée à la signalisation anormale des récepteurs du TNF- α (TNFR1) et de c-Src, ce qui entrainerait une perte de la régulation entre les jonctions communicantes (*gap junctions*) ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'IL-8. Un CFTR actif localisé dans les radeaux lipidiques à la membrane cellulaire est associé au complexe de TNF α /IL1 β -TLR, ce qui aurait pour effet d'atténuer la voie de signalisation pro-inflammatoire NF κ B (148).

En outre, l'activation constitutive de NF κ B, conduisant à une sécrétion excessive d'IL-8 est aussi associée à une déficience de la fonction du canal CFTR ou à l'accumulation de la protéine CFTR Δ F508 dans le réticulum endoplasmique, qui mène au stress cellulaire (150). Or, les niveaux de I κ B α cytosolique, qui inhibe l'activation de NF κ B, sont diminués chez les tissus de FK (151) Globalement, ces études supportent l'idée que la dysfonction du CFTR est associée à l'activation de NF κ B.

Or, Perez *et al.* (115) ont évalué les effets du traitement avec le CFTRinh-172 sur des cellules des voies respiratoires stimulées par le TNF- α et IL-1 β , sur le niveau de phosphorylation NF κ B et ont démontré, en situation inflammatoire, une augmentation significative de la phosphorylation de NF κ B lorsque le CFTR est inhibé pharmacologiquement. Dans notre étude, nous avons décidé d'évaluer le niveau de phosphorylation NF κ B sur les Caco-2/15 dont le CFTR a été invalidé génétiquement seulement, puisque la sécrétion d'IL-8 demeurerait inchangée lorsque le CFTR des Caco-2/15 ont subit l'inhibition par le CFTRinh-172.

La déplétion génique du CFTR induit une déplétion protéique du CFTR qui peut causer des changements intracellulaires, ce que l'inhibition pharmacologique ne fait pas. La déplétion génique du CFTR peut entrainer des changements du pH intracellulaire qui, provoquent une modulation du trafic intracellulaire et des processus d'endocytose et d'exocytose (152). De

plus, la perte du CFTR peut engendrer plusieurs changements, puisque le CFTR interagit physiquement avec d'autres transporteurs, enzymes et protéines du cytosquelette pour former un complexe multimoléculaire de signalisation. Ces interactions se font via les multiples domaines PDZ des protéines partenaires qui lient le domaine C-terminal du CFTR qui possède une séquence consensus reconnue par des domaines PDZ (153). Cette extrémité est très conservée chez différentes espèces, mais elle n'est pas indispensable à l'activité du canal CFTR mais l'est pour sa localisation apicale (154) et sa stabilité (155).

Il n'est pas exclus que l'infection lentivirale ou l'invalidation génique du CFTR ait pu avoir des effets collatéraux non-spécifiques. Cependant, comme nous avons utilisé à titre de condition contrôle les cellules Scr qui ont été infectées avec le même lentivirus et que nous n'avons pas observé les mêmes effets, ceci est une preuve que ce n'est pas l'infection lentivirale comme telle qui explique les résultats obtenus.

En résumé, la hausse de la sécrétion d'IL-8, suite à l'invalidation génique du CFTR, n'est ni provoquée par l'augmentation de son expression génique ni par l'augmentation de l'activation et de l'expression de la voie p38MAPK. Par contre, nos résultats suggèrent que la déplétion génique du CFTR augmente le niveau de phosphorylation de NF κ B conduisant ainsi à une sécrétion plus élevée d'IL-8.

5.3 Actions anti-inflammatoires de la vitamine D

Comme nous avons démontré que l'invalidation génique du CFTR induit un état pro-inflammatoire dans les cellules Caco-2/15, nous avons, par la suite, voulu explorer les propriétés anti-inflammatoires de la vitamine D dans ce même modèle.

a) Sécrétion d'interleukine-8

Autre que sa fonction dans l'homéostasie du calcium, la vitamine D joue un rôle dans la modulation du système immunitaire ainsi que dans l'inflammation. Plusieurs études ont

d'ailleurs confirmé que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ peut moduler la réponse inflammatoire face à un antigène à la surface des cellules épithéliales en réduisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles IL-6 et IL-8 en réponse au *Pseudomonas Aeruginosa* et au LPS (156, 157).

Il nous est donc apparu pertinent d'examiner le rôle de la vitamine D (sous sa forme bioactive $1,25(\text{OH})_2\text{D}$) dans la régulation de la réponse inflammatoire des cellules Caco-2/15 dont le CFTR est altéré et ce, en présence des mêmes inducteurs pro-inflammatoires soit le TNF- α et l'IL-1 β . Nous avons observé que la vitamine D module à la baisse le profil inflammatoire de la cellule intestinale dont le CFTR a été manipulé génétiquement. Toutefois, l'effet de la vitamine D sur la sécrétion d'IL-8 ne se manifeste que lorsque les cellules sont traitées avec les cytokines TNF- α ou IL-1 β et non en situation basale. De plus, étonnamment, l'effet de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ n'est observé que chez les cellules invalidées génétiquement pour le CFTR. Les cellules Scr traitées à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ne démontrent aucune variation de la sécrétion d'IL-8 induite par le TNF- α ou l'IL-1 β . Finalement, il est intéressant de constater que nous avons observé une tendance à la diminution de la sécrétion d'IL-8 en réponse au TNF- α et à l'IL-1 β lors de la combinaison de traitements mais que ces effets n'ont pas été retrouvés avec l'inhibiteur seul. Nous spéculons que la combinaison d'évènements intracellulaires liés à la déplétion protéique du CFTR et à la présence de l'inhibiteur peut expliquer ces résultats. Toutefois, pourquoi ceci survient seulement pour ces expériences précises et non pour les autres paramètres dont la sécrétion d'IL-8 en absence $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ demeure inexplicé.

En utilisant un modèle expérimental différent, soit des lignées cellulaires épithéliales trachéales et bronchiques FK, McNally *et al.* ont notamment confirmé que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe la sécrétion d'IL-8 basale et induite soit par le LPS ou par du milieu conditionné de *Pseudomonas Aeruginosa* (158). De plus, Hidaka *et al.* ont également étudié les effets anti-inflammatoires de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, sur des cellules intestinales et ont démontré que la sécrétion d'IL-8 induite par le LPS était supprimée par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Toutefois, cette diminution est médiée par une augmentation de la sécrétion de CD14 soluble par les cellules épithéliales intestinales (85). Il est suggéré par ces auteurs que le CD14 soluble neutralise le

LPS extracellulaire, ce qui atténue la sécrétion subséquente d'IL-8 en réponse à ce produit bactérien.

b) Expression génique d'IL-8

La forme hormonale de la vitamine D peut être impliquée dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes donc ceux qui modulent la réponse inflammatoire du tissu intestinal. De plus, il a été démontré dans d'autres modèles cellulaires tels que les monocytes (MonoT0) et les macrophages (MØT7) humains qu'elle module à la baisse l'expression d'IL-8 suite à un traitement au LPS ou avec la cytokine pro-inflammatoire TNF- α (159). De plus, Harant *et al.* ont notamment confirmé que la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ a un effet inhibiteur non seulement sur les niveaux d'ARNm d'IL-8 mais également sur l'activation du promoteur d'IL-8 dans la lignée cellulaire de mélanome humain A3 après stimulation au TNF- α (160).

Par contre, ceci ne semble pas être observé au sein de notre modèle de cellules intestinales puisque suite à la mesure du niveau d'expression génique de l'IL-8 des cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été manipulé ou non, nous n'avons pu observer aucun effet de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ sur l'expression génique de l'IL-8 et ce, en condition de base ou suite à un traitement avec les cytokines pro-inflammatoires TNF- α ou IL-1 β . Cependant, nous ne pouvons exclure que la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ exerce un effet sur la stabilité de l'ARNm de l'IL-8 en diminuant celle-ci.

c) Expression et niveau de phosphorylation de la voie p38MAPK

Nous avons formulé comme hypothèse que la vitamine D, pouvait exercer son effet anti-inflammatoire en diminuant l'activation des voies MAPK. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons ciblé, dans un premier temps, la voie de p38MAPK et avons investigué si l'ajout de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ aux cellules Caco-2/15 ayant subi une manipulation du CFTR module le niveau d'expression et de phosphorylation de celle-ci. Nous avons effectivement observé que la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ induisait une diminution marquée du niveau de phosphorylation de p38MAPK par rapport aux cellules non-traitées à la 1,25(OH) $_2$ D $_3$.

Des études *in vivo* réalisées sur le modèle de souris Smad3 $-/-$, un modèle de maladie inflammatoire intestinale, ayant reçu un régime riche en vitamine D a démontré une forte diminution de la phosphorylation de p38MAPK au sein des cellules de la lamina propria. Dans cette étude, ils ont confirmé que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ agissait sur d'autres voies de signalisation, puisque celle-ci peut moduler à la baisse la phosphorylation de JNK (86). L'effet inhibiteur de la vitamine D sur la phosphorylation de p38MAPK ne se limite pas qu'à l'intestin puisque cet effet a également été démontré au sein d'autres modèles cellulaires tels les monocytes traités au LPS (89), des cellules de la prostate et des kératinocytes traités au TNF- α (161, 162). Plus récemment, Ding *et al.* ont confirmé que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ atténue la phosphorylation d'une autre voie MAPK soit ERK1/2, mais dans les adipocytes humains (87).

Encore ici, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exerce son effet suppresseur seulement sur les cellules dont le CFTR est déplété génétiquement, puisque nous ne remarquons aucun effet sur le niveau de phosphorylation de p38MAPK des cellules Scr ou des cellules dont le CFTR est seulement inhibé pharmacologiquement. Pour expliquer ceci, nous spéculons que l'effet anti-inflammatoire de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ n'est manifeste que lorsque l'état inflammatoire de la cellule atteint un certain seuil justifiant l'activation de mécanismes protecteurs additionnels. Comme l'état inflammatoire des cellules invalidées génétiquement est plus accentué, ceci peut expliquer pourquoi la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ démontre des propriétés anti-inflammatoires dans ces cellules et non dans les cellules ayant un CFTR intact. Aussi, l'invalidation génique du CFTR peut causer des dérangements intracellulaires/membranaires qui peuvent favoriser l'action anti-inflammatoire de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Dans le but de confirmer que l'effet anti-inflammatoire de la vitamine D passe par son action inhibitrice sur la phosphorylation de p38MAPK, nous avons eu recours à l'inhibiteur de la phosphorylation de p38MAPK, BIRB796. L'inhibition partielle de p38MAPK n'élimine pas l'effet de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur la sécrétion d'IL-8. Par contre, l'inhibition complète de p38MAPK, avec une concentration plus élevée de BIRB796, neutralise complètement l'action de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, suggérant ainsi que la voie p38MAPK représente une cible de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

d) Expression et niveau de la phosphatase-1 MAPK (MKP-1)

Nous avons confirmé qu'il n'y avait aucun effet de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur l'expression de MKP-1 entre les cellules dont le CFTR a été invalidé et/ou inhibé et les cellules contrôles. L'effet inhibiteur de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur la phosphorylation de p38MAPK n'est donc pas causé par l'induction de la phosphatase MKP-1. Nos résultats contredisent ceux de Zhang *et al.* qui ont démontré que la vitamine D, à une dose intermédiaire (10^{-8}M) à celles utilisées dans la présente étude, a induit l'expression génique et protéique de MKP-1 au sein de monocytes humains, ce qui médierait son effet sur la phosphorylation de p38MAPK. En effet, MKP-1 est une phosphatase qui déphosphoryle les résidus thréonine et tyrosine situés sur les MAPK activés, avec une préférence pour p38MAPK et JNK. Elle exerce donc une action anti-inflammatoire en contrôlant l'activité des MAPK (89). La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimule l'expression de MKP-1 en augmentant la liaison du VDR au VDRE ainsi que l'accroissement de l'acétylation des histones H4 au niveau du site du promoteur du gène de MKP-1. Nos résultats divergeants peuvent s'expliquer par certaines hypothèses : 1) le modèle cellulaire différent ou encore 2) l'invalidation génique du CFTR qui peut influencer l'expression du VDR, modifier la liaison de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ à son récepteur ou encore provoquer un défaut dans l'acétylation des histones H4 au niveau du site du promoteur MKP-1.

e) Expression et niveau de phosphorylation du facteur de transcription NFκB

Nous avons subséquemment poussé plus loin notre investigation des mécanismes par lesquels la vitamine D pourrait contribuer à atténuer l'inflammation intestinale liée à la FK. Nous avons conséquemment examiné l'effet de la forme bioactive de la vitamine D sur l'expression et le niveau de phosphorylation de NFκB des cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été déplété ou non génétiquement. L'ajout de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a provoqué une légère diminution du niveau de phosphorylation de NFκB sur les cellules dont le CFTR est invalidé génétiquement ou non comparativement aux cellules non-traitées à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ et ce, suite au traitement avec l'IL-1β.

Plusieurs études non-FK ont prouvé que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe la phosphorylation de IκBα, ce qui empêche sa dégradation par le système du protéasome. Ceci entraîne donc une

augmentation des niveaux de protéine I κ B α dans le cytoplasme qui a pour conséquence d'empêcher la translocation de NF κ B vers le noyau (87, 163, 164).

Ceci a également été démontré dans un contexte de FK (158). Chen *et al.* ont démontré plus spécifiquement la mécanistique sous-jacente à l'effet de la forme active de la vitamine D. Ils ont démontré que le VDR peut interagir directement avec la sous-unité p65 de NF κ B dans le cytosol pour bloquer sa translocation nucléaire. De plus, le VDR se lie à IKK β , la kinase qui phosphoryle I κ B α , ce qui empêche la phosphorylation de ce dernier et ultimement bloque la translocation et l'activation de NF κ B (165).

f) Expression du récepteur nucléaire de la vitamine D et des hydroxylases intestinales impliquées dans son métabolisme

Les observations que les effets anti-inflammatoires de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ sont plus accentués au sein des cellules invalidées génétiquement pour le CFTR nous ont amenés à postuler que la déplétion génique du CFTR pouvait induire des altérations du métabolisme et/ou de l'action intra-entérocytaire de la vitamine D. Nous avons donc examiné l'expression génique de trois molécules impliquées à ces niveaux.

1-CYP24

Le gène qui code pour la CYP24 ou 24-hydroxylase est hautement inductible par la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ puisqu'il possède plusieurs éléments de réponse à la vitamine D (VDRE) sur son promoteur (166). Les cellules dont le CFTR a été invalidé génétiquement, démontrent une tendance vers une plus faible induction de la CYP24 par la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ que les cellules Scr.

Comme la CYP24 a pour rôle principal de cataboliser la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ afin de réguler son action et que son expression tend à être plus faible au sein des cellules invalidées pour le CFTR, nous postulons que le niveau intracellulaire de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ pourrait être plus élevé dans ces cellules. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi l'effet anti-inflammatoire de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ est plus marqué au sein des cellules invalidées génétiquement.

Bien qu'il nous est difficile d'expliquer pourquoi la déplétion génique du CFTR tend à influencer l'expression du gène qui code pour CYP24, il a été démontré que la déplétion du CFTR peut causer des anomalies mitochondriales, incluant une diminution de l'expression différentielle des gènes mitochondriaux, des altérations dans la phosphorylation oxydative, ainsi qu'un stress oxydatif accru qui pourrait éventuellement réduire l'activité des enzymes mitochondriales, dont CYP24, qui sont impliquées dans le métabolisme de la vitamine D (167).

Concernant l'effet du CFTR inh-172 sur l'expression de CYP24, nous spéculons que le CFTR inh-172 exerce des effets indépendants de son action sur le CFTR. En effet, Kelly et al. ont démontré que deux inhibiteurs du CFTR (CFTR inh-172 et GlyH101) à une dose de 20µM altère la fonction mitochondriale au sein de cellules n'exprimant pas le CFTR (135). Comme le CYP24 est un cytochrome mitochondrial, la diminution de son expression au sein des cellules traitées avec 20µM de CFTR inh-172 pourrait dériver de l'effet mitochondrial de ce composé.

2-CYP27B1

L'enzyme de bioconversion de la vitamine D, la CYP27B1 ou 1α-hydroxylase, est présente dans quelques organes, y compris l'intestin grêle et le côlon (168), ce que nos résultats sur les Caco-2/15 ont confirmé. Cette enzyme permet de métaboliser la 25(OH)D en la forme bioactive 1,25(OH)₂D. La manipulation du CFTR, l'induction d'un état inflammatoire ou encore la présence de 1,25(OH)₂D₃ n'a eu aucun impact sur l'expression génique de la CYP27B1. Bien que préliminaires, ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que l'effet anti-inflammatoire plus marqué de la 1,25 (OH)₂D₃ au sein des cellules invalidées génétiquement pour le CFTR n'est pas médié par une hausse de sa synthèse.

3-Récepteur nucléaire de la vitamine D (VDR)

Les actions moléculaires de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sont médiées par sa liaison avec le VDR. Suite à l'interaction du ligand avec son récepteur, il s'ensuit la régulation transcriptionnelle de gènes vitamine D-dépendants (130). Nos résultats suggèrent que l'expression génique du VDR n'est pas altérée par la manipulation du CFTR. Ainsi, l'effet anti-inflammatoire plus marqué de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ au sein des cellules invalidées génétiquement pour le CFTR ne peut s'expliquer par une hausse de l'expression de son récepteur nucléaire.

Par contre, l'induction d'un état inflammatoire cause une baisse significative de l'expression du VDR dans certaines conditions. En effet, indépendamment du statut du CFTR, l'ajout d'IL- 1β en présence de 10^{-7}M de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ cause une diminution marquée de l'expression génique du VDR.

D'après les études menées par Froicu *et al.* la présence du VDR régule l'inflammation intestinale, puisque les souris VDR $-/-$ ont développé une colite sévère et présentaient une mortalité plus élevée comparativement aux souris donc le VDR était présent (VDR $+/+$) (169). Liu *et al.* ont aussi examiné l'expression du VDR, mais dans des biopsies du côlon de patients atteints de la maladie de Crohn et de colite ulcéreuse. Le VDR est plus exprimé dans les cellules épithéliales de côlon normal que dans le côlon des patients atteints de maladie inflammatoire intestinale. Ils suggèrent que l'inflammation peut réguler à la baisse les niveaux d'expression du VDR dans les cellules épithéliales intestinales (170), ce qui corrobore les résultats que nous avons obtenus. Dans un autre modèle, Coughlan *et al.* ont démontré que l'inflammation pulmonaire induite par *Aspergillus fumigatus* diminue l'expression du VDR dans les macrophages et les cellules épithéliales des voies respiratoires. Le VDR semblerait avoir un rôle thérapeutique important pour les patients FK (171).

En résumé, la forme bioactive de la vitamine D semble agir seulement en situation d'inflammation sévère et lorsque le CFTR est déplété, puisqu'elle permet de moduler seulement le profil inflammatoire de cellules intestinales Caco 2/15 dont le CFTR a été manipulé génétiquement. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ provoque une diminution de la sécrétion et non de

l'expression d'IL-8. L'effet anti-inflammatoire de ce métabolite de la vitamine D semble dépendre grandement de la voie p38MAPK puisqu'elle diminue le niveau de phosphorylation de celle-ci. Cependant, cette diminution n'est pas causée par l'induction de l'expression de la phosphatase MKP-1. Cette vitamine a provoqué une légère diminution du niveau de phosphorylation de NFκB après induction pro-inflammatoire. L'effet plus marqué de la 1,25(OH)₂D₃ dans les cellules invalidées génétiquement pour le CFTR n'est pas causée par l'augmentation de sa synthèse ou de l'expression de son récepteur nucléaire mais pourrait être médié par une diminution de son catabolisme.

5.4 Forces et limites

a) Modèle choisi : La lignée cellulaire intestinale Caco-2/15 est une lignée transformée d'origine cancéreuse, ce qui a pu modifier certains aspects de son métabolisme. De plus, ces cellules sont polynucléées, ce qui complique les manipulations génétiques, telles l'inactivation génique par infection lentivirale, ce qui explique en partie pourquoi nous n'avons réussi qu'à faire une inactivation génique partielle. Cependant elles présentent aussi des aspects positifs: les cellules adoptent des caractéristiques propres aux entérocytes : elles développent des cryptes et des villosités, expriment les enzymes digestives et exhibent des fonctions absorbatives et sécrétoires (114, 172). De plus, ces cellules expriment toute la machinerie enzymatique et cellulaire liée au métabolisme de la vitamine D (173). Elles répondent à l'ajout de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ par la modulation de l'expression des gènes vitamine D-dépendants impliqués dans l'absorption du calcium, le catabolisme de la vitamine D et la prolifération et la différenciation cellulaire (174). Le choix de ce modèle s'explique également par sa durée de vie en culture. Contrairement aux explants intestinaux ou aux cellules primaires intestinales, dont la durée de vie dépasse difficilement 24 heures en culture, les cellules Caco2/15 sont robustes et permettent des investigations de plus longue durée (175). L'utilisation des cellules Scr comme groupe de comparaison est également une force puisqu'il nous a permis de contrôler pour les effets non-spécifiques liés au vecteur lentiviral ou au processus d'infection lentivirale. Par contre, l'inactivation génique du CFTR peut avoir provoqué des effets collatéraux ou encore non-spécifiques qui sont, en fait, responsables des résultats observés dans ce projet. Il faut donc demeurer prudent avec l'interprétation de nos résultats.

Finalement, l'utilisation de l'inhibiteur spécifique du CFTR, CFTRinh-172, n'a pas eu les résultats escomptés. Ceci peut être expliqué par le fait qu'il n'inhibe pas efficacement, aux concentrations étudiées, la fonction du CFTR. Comme la mesure du courant chlorure n'a pas été faite dans ce projet de maîtrise, ceci représente une limite importante de notre étude qui nous empêche de conclure avec certitude que seule la déplétion génique du CFTR (et non l'inhibition de sa fonction de canal chlorure) est responsable de la modification du statut inflammatoire de la cellule Caco-2/15.

b) Approches expérimentales :

La méthode d'ELISA est rapide et simple. Cette technique était visiblement l'une des meilleures approches pour l'étude de la sécrétion d'IL-8. L'utilisation d'un kit commercial a permis une meilleure fiabilité. La technique par Western Blot est l'une des méthodes qui comporte plusieurs limites. Il s'agit d'une technique "semi-quantitative" car nous quantifions en fait un ratio établi par rapport à une protéine de référence (actine). Bien qu'il soit possible en Western Blot d'observer des variations dans les niveaux d'expression protéique, les biais méthodologiques peuvent être nombreux. Par exemple, un problème de migration, de voltage, de transfert, l'utilisation de différente membrane (PVDF vs nitrocellulose), la dilution des anticorps, si le film est saturé, le type de révélation, les différences entre les intensités, sont tous des variables méthodologiques qui peuvent venir biaiser les résultats. La technique d'immunofluorescence pour le NFκB est simple mais elle n'est pas optimale puisque nous avons procédé à une évaluation qualitative du marquage obtenu. Il aurait été plus précis de quantifier l'expression et le niveau de phosphorylation de NFκB à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images. Cette quantification est présentement en cours dans le laboratoire. La méthode RT-PCR utilisée dans ce travail n'est pas la meilleure technique comparativement au PCR quantitatif (qPCR). La qPCR demeure la plus fiable puisqu'elle consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle en temps réel grâce à un marqueur fluorescent. Elle permet de toujours suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction et non seulement à la fin de la PCR. La méthode de la RT-PCR demeure semi-quantitative et est surtout utilisée pour confirmer si tel ou tel gène est exprimé. Toutefois elle est moins dispendieuse que le PCR quantitatif. Les résultats obtenus dans le présent mémoire doivent donc faire l'objet d'une validation par qPCR.

CHAPITRE 6. Perspectives futures et Conclusion

De ces travaux émergent plusieurs avenues de recherche à explorer. À court terme, l'évaluation de la stabilité de l'ARNm de l'IL-8 suite à la déplétion génique du CFTR ou encore en réponse à des traitements à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ s'avère une étape incontournable. Comme la voie p38MAPK semble peu affectée par l'inactivation du CFTR, il sera intéressant d'évaluer les niveaux de phosphorylation de deux autres voies de signalisation MAPK: ERK et JNK. L'inhibition pharmacologique à l'aide du CFTR inh-172 doit être confirmée par des mesures du courant chlorure et si ceci s'avère impossible, l'utilisation d'un autre inhibiteur du CFTR tel que le GlyH-101 sera indiquée. À l'inverse, l'utilisation de potentialisateurs du CFTR tels le VX-770 (Ivacaftor) pourrait nous permettre d'étudier la réversibilité des effets pro-inflammatoires associées à la déplétion génique du CFTR. En effet, le VX-770 pourrait nous permettre de potentialiser les canaux CFTR résiduels et donc de restaurer un état s'approchant de la normale puisque notre déplétion génique et protéique n'est que partielle.

À moyen terme, des études in vivo pourraient être envisagées afin de tester l'hypothèse que l'administration de vitamine D corrige le phénotype intestinal inflammatoire de souris *Cftr* $-/-$ ou encore porteuse de la mutation ΔF508 , la mutation la plus fréquemment rencontrée en FK. Outre les mesures d'IL8, la sécrétion des autres cytokines pro-inflammatoires, tels que (IL-1, IL-6 et $\text{TNF}\alpha$) et anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10) pourraient être mesurées par ELISA au sein des cellules Caco-2/15 dont le CFTR a été invalidé et/ou inhibé. De plus, il serait fort intéressant d'étudier la réponse inflammatoire en stimulant les cellules intestinales avec des produits bactériens tels que *Pseudomonas aeruginosa* en parallèle avec les stimulateurs $\text{TNF}\alpha$ et $\text{IL}1\beta$ puisqu'il a été démontré récemment que l'intestin des FK présente une dysbiose bactérienne (47). Ces études ont été réalisées sur cellules en prolifération. Or, il s'avèrera important de les reproduire sur des cellules Caco-2 différenciées (cultivées sur filtre). En terminant, afin d'étudier la relation entre le CFTR, la vitamine D et la barrière intestinale, il serait aussi pertinent d'investiguer la perméabilité cellulaire dans cette étude.

En conclusion, ce projet de maîtrise nous a permis de mieux comprendre l'implication du CFTR comme facteur étiologique de l'inflammation intestinale associée à la FK ainsi que le potentiel anti-inflammatoire intestinal de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Ces résultats pourraient servir de base à l'élaboration et l'évaluation de traitements plus adéquats qui permettraient d'atténuer

ou d'éliminer l'inflammation intestinale dont souffrent ces patients afin de leur assurer ultimement une meilleure qualité de vie.

Bibliographie

1. Cystic Fibrosis Canada. The Canadian Cystic Fibrosis Registry 2012 Annual Report. February, 2014, 2012. Rapport no.: rapport no: 10684 5100 RR0001.
2. Schmutz Gr. Imagerie de l'appareil digestif supérieur : oesophage, estomac, duodénum. Paris: Masson; 1999. viii, 225 p. p.
3. Le dictionnaire visuel. Appareil digestif [En ligne]. [cité le 29 septembre 2014]. Disponible: <http://www.ikonet.com/fr/ledictionnairevisuel/etre-humain/anatomie/appareil-digestif.php>
4. Klippert P, Borm P, Noordhoek J. Prediction of intestinal first-pass effect of phenacetin in the rat from enzyme kinetic data--correlation with in vivo data using mucosal blood flow. *Biochemical pharmacology*. 1982;31(15):2545-8. Epub 1982/08/01.
5. Clés de santé. Structure de la paroi intestinale [En ligne]. 10 mai 2009 [cité le 29 septembre 2014]. Disponible: <http://clesdesante.com/article-31263230-html/>
6. Spahn TW, Kucharzik T. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut*. 2004;53(3):456-65. Epub 2004/02/13.
7. Levy E, Loirdighi N, Thibault L, Nguyen TD, Labuda D, Delvin E, et al. Lipid processing and lipoprotein synthesis by the developing human fetal colon. *The American journal of physiology*. 1996;270(5 Pt 1):G813-20. Epub 1996/05/01.
8. Andreu P, Perret C, Romagnolo B. [Wnt and gastrointestinal stem cells: dangerous connections]. *Medecine sciences : M/S*. 2006;22(8-9):693-5. Epub 2006/09/12. Wnt et cellules souches intestinales : des liaisons dangereuses...
9. Duerkop BA, Vaishnava S, Hooper LV. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity*. 2009;31(3):368-76. Epub 2009/09/22.
10. Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(6):435-46. Epub 2008/05/27.
11. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, et al. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(1):55-65. Epub 1995/01/01.
12. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449(7164):819-26. Epub 2007/10/19.
13. Wells JM, Loonen LM, Karczewski JM. The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2010;300(1):41-8. Epub 2009/09/29.
14. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118(2):229-41. Epub 2004/07/21.
15. Kelly D, Conway S. Bacterial modulation of mucosal innate immunity. *Molecular immunology*. 2005;42(8):895-901. Epub 2005/04/15.
16. Lotz M, Menard S, Hornef M. Innate immune recognition on the intestinal mucosa. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2007;297(5):379-92. Epub 2007/04/27.

17. Sanz Y, De Palma G. Gut microbiota and probiotics in modulation of epithelium and gut-associated lymphoid tissue function. *International reviews of immunology*. 2009;28(6):397-413. Epub 2009/12/04.
18. Magalhaes JG, Tattoli I, Girardin SE. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Seminars in immunology*. 2007;19(2):106-15. Epub 2007/02/28.
19. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science (New York, NY)*. 1989;245(4922):1059-65. Epub 1989/09/08.
20. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science (New York, NY)*. 1989;245(4922):1073-80. Epub 1989/09/08.
21. Childers M, Eckel G, Himmel A, Caldwell J. A new model of cystic fibrosis pathology: lack of transport of glutathione and its thiocyanate conjugates. *Medical hypotheses*. 2007;68(1):101-12. Epub 2006/08/29.
22. Frelet A, Klein M. Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis. *FEBS letters*. 2006;580(4):1064-84. Epub 2006/01/31.
23. Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature structural & molecular biology*. 2004;11(10):918-26. Epub 2004/09/29.
24. Gadsby DC, Vergani P, Csanady L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*. 2006;440(7083):477-83. Epub 2006/03/24.
25. Oxford University Gene Medecine. Structure du CFTR [En ligne]. [modifié le 25 juillet 2012; cité le 29 septembre 2014]. Disponible: <http://users.ox.ac.uk/~genemed/cysticfibrosis/protein.html>
26. Engelhardt JF, Yankaskas JR, Ernst SA, Yang Y, Marino CR, Boucher RC, et al. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nature genetics*. 1992;2(3):240-8. Epub 1992/11/01.
27. Munck A. Cystic fibrosis: Evidence for gut inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;52:180-3. Epub 2014/02/20.
28. Zhou Z, Wang X, Liu HY, Zou X, Li M, Hwang TC. The two ATP binding sites of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) play distinct roles in gating kinetics and energetics. *The Journal of general physiology*. 2006;128(4):413-22. Epub 2006/09/13.
29. Zhou Z, Wang X, Li M, Sohma Y, Zou X, Hwang TC. High affinity ATP/ADP analogues as new tools for studying CFTR gating. *The Journal of physiology*. 2005;569(Pt 2):447-57. Epub 2005/10/15.
30. Kunzelmann K, Schreiber R, Nitschke R, Mall M. Control of epithelial Na⁺ conductance by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2000;440(2):193-201. Epub 2000/07/18.
31. Gentsch M, Cui L, Mengos A, Chang XB, Chen JH, Riordan JR. The PDZ-binding chloride channel ClC-3B localizes to the Golgi and associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-interacting PDZ proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(8):6440-9. Epub 2002/12/10.
32. Jovov B, Ismailov, II, Berdiev BK, Fuller CM, Sorscher EJ, Dedman JR, et al. Interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and outwardly

- rectified chloride channels. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(49):29194-200. Epub 1995/12/08.
33. Yoo D, Flagg TP, Olsen O, Raghuram V, Foskett JK, Welling PA. Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(8):6863-73. Epub 2003/11/08.
34. Bradbury NA, Jilling T, Berta G, Sorscher EJ, Bridges RJ, Kirk KL. Regulation of plasma membrane recycling by CFTR. *Science (New York, NY)*. 1992;256(5056):530-2. Epub 1992/04/24.
35. Linsdell P, Hanrahan JW. Glutathione permeability of CFTR. *The American journal of physiology*. 1998;275(1 Pt 1):C323-6. Epub 1998/08/05.
36. Kunzelmann K, Mehta A. CFTR: a hub for kinases and crosstalk of cAMP and Ca²⁺. *The FEBS journal*. 2013;280(18):4417-29. Epub 2013/07/31.
37. Bruscia EM, Zhang PX, Ferreira E, Caputo C, Emerson JW, Tuck D, et al. Macrophages directly contribute to the exaggerated inflammatory response in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-/- mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2009;40(3):295-304. Epub 2008/09/09.
38. Li L, Somerset S. Digestive system dysfunction in cystic fibrosis: Challenges for nutrition therapy. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2014;46(10):865-74. Epub 2014/07/24.
39. Bonadia LC, de Lima Marson FA, Ribeiro JD, Paschoal IA, Pereira MC, Ribeiro AF, et al. CFTR genotype and clinical outcomes of adult patients carried as cystic fibrosis disease. *Gene*. 2014;540(2):183-90. Epub 2014/03/04.
40. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2009;373(9678):1891-904. Epub 2009/05/01.
41. Scott A. Cystic fibrosis. *Radiologic technology*. 2013;84(5):493-513; quiz 4-8. Epub 2013/05/21.
42. Miki H, Zhou Z, Li M, Hwang TC, Bompadre SG. Potentiation of disease-associated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutants by hydrolyzable ATP analogs. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(26):19967-75. Epub 2010/04/22.
43. Messick J. A 21st-century approach to cystic fibrosis: optimizing outcomes across the disease spectrum. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2010;51 Suppl 7:S1-7; quiz 3 p following S7. Epub 2010/09/10.
44. Semrad CE. Approach to the patient with diarrhea and malabsorption. In Goldman L, Schafer AI, eds *Cecil Medicine 24th ed*. 2011; Volume 1.
45. Cipolli M, Castellani C, Wilcken B, Massie J, McKay K, Gruca M, et al. Pancreatic phenotype in infants with cystic fibrosis identified by mutation screening. *Archives of disease in childhood*. 2007;92(10):842-6. Epub 2007/04/24.
46. Houwen RH, van der Doef HP, Sermet I, Munck A, Hauser B, Walkowiak J, et al. Defining DIOS and constipation in cystic fibrosis with a multicentre study on the incidence, characteristics, and treatment of DIOS. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2010;50(1):38-42. Epub 2009/06/16.
47. De Lisle RC, Borowitz D. The cystic fibrosis intestine. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013;3(9):a009753. Epub 2013/06/22.
48. De Lisle RC. Disrupted tight junctions in the small intestine of cystic fibrosis mice. *Cell and tissue research*. 2014;355(1):131-42. Epub 2013/10/31.

49. Wu Y, Wang S, Li C. In vitro analysis of PDZ-dependent CFTR macromolecular signaling complexes. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012(66). Epub 2012/08/22.
50. Flass T, Narkewicz MR. Cirrhosis and other liver disease in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2012. Epub 2012/12/26.
51. Parisi GF, Di Dio G, Franzonello C, Gennaro A, Rotolo N, Lionetti E, et al. Liver disease in cystic fibrosis: an update. *Hepatitis monthly*. 2013;13(8):e11215. Epub 2013/10/31.
52. Singh VV, Toskes PP. Small bowel bacterial overgrowth: presentation, diagnosis, and treatment. *Current gastroenterology reports*. 2003;5(5):365-72. Epub 2003/09/10.
53. Werlin SL, Benuri-Silbiger I, Kerem E, Adler SN, Goldin E, Zimmerman J, et al. Evidence of intestinal inflammation in patients with cystic fibrosis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2010;51(3):304-8. Epub 2010/06/01.
54. Norkina O, Kaur S, Ziemer D, De Lisle RC. Inflammation of the cystic fibrosis mouse small intestine. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2004;286(6):G1032-41. Epub 2004/01/24.
55. Ollero M, Junaidi O, Zaman MM, Tzamelis I, Ferrando AA, Andersson C, et al. Decreased expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma in *cftr*^{-/-} mice. *Journal of cellular physiology*. 2004;200(2):235-44. Epub 2004/06/03.
56. Cafferata EG, Guerrico AM, Pivetta OH, Santa-Coloma TA. NF-kappaB activation is involved in regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by interleukin-1beta. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(18):15441-4. Epub 2001/03/30.
57. Lebowitz J, Edinger RS, An B, Perry CJ, Onate S, Kleyman TR, et al. Ikappab kinase-beta (*ikkb*) modulation of epithelial sodium channel activity. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(40):41985-90. Epub 2004/08/05.
58. Althaus M. ENaC inhibitors and airway re-hydration in cystic fibrosis: state of the art. *Current molecular pharmacology*. 2013;6(1):3-12. Epub 2013/04/04.
59. Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;88(2):296-307. Epub 2003/01/10.
60. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends in biochemical sciences*. 2004;29(12):664-73. Epub 2004/11/17.
61. Brenza HL, DeLuca HF. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2000;381(1):143-52. Epub 2000/10/06.
62. Bland R, Walker EA, Hughes SV, Stewart PM, Hewison M. Constitutive expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in a transformed human proximal tubule cell line: evidence for direct regulation of vitamin D metabolism by calcium. *Endocrinology*. 1999;140(5):2027-34. Epub 1999/04/28.
63. Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, Koderu Y, Kawaguchi Y, Hosoya T, et al. Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1alpha,25(OH)2D3 in intact animals. *Endocrinology*. 1999;140(5):2224-31. Epub 1999/04/28.
64. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2004;19(3):429-35. Epub 2004/03/26.

65. Holick MF. Vitamin D and sunlight: strategies for cancer prevention and other health benefits. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3(5):1548-54. Epub 2008/06/14.
66. Abreu MT, Kantorovich V, Vasiliauskas EA, Gruntmanis U, Matuk R, Daigle K, et al. Measurement of vitamin D levels in inflammatory bowel disease patients reveals a subset of Crohn's disease patients with elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and low bone mineral density. *Gut*. 2004;53(8):1129-36. Epub 2004/07/13.
67. Bacchetta J, Ranchin B, Dubourg L, Cochat P. [Vitamin D revisited: a cornerstone of health?]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*. 2010;17(12):1687-95. Epub 2010/10/19. Vitamine D : un acteur majeur en sante ?
68. Zierold C, Mings JA, DeLuca HF. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;88(2):234-7. Epub 2003/01/10.
69. Chen KS, DeLuca HF. Cloning of the human 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochimica et biophysica acta*. 1995;1263(1):1-9. Epub 1995/07/25.
70. Hernandez T, Stoermann-Chopard C. [Vitamin D and chronic kidney disease: increasing role for an old vitamin]. *Revue medicale suisse*. 2012;8(361):2140-5. Epub 2012/11/24. Vitamine D et insuffisance renale chronique: regain d'interet pour une vitamine oubliee.
71. Davis CD, Milner JA. Nutrigenomics, vitamin D and cancer prevention. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*. 2011;4(1):1-11. Epub 2011/03/25.
72. Cranney A, Horsley T, O'Donnell S, Weiler H, Puil L, Ooi D, et al. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health. Evidence report/technology assessment. 2007(158):1-235. Epub 2007/12/20.
73. Hollander D, Muralidhara KS, Zimmerman A. Vitamin D-3 intestinal absorption in vivo: influence of fatty acids, bile salts, and perfusate pH on absorption. *Gut*. 1978;19(4):267-72. Epub 1978/04/01.
74. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *American journal of physiology Renal physiology*. 2005;289(1):F8-28. Epub 2005/06/14.
75. Wasserman RH. Vitamin D and the dual processes of intestinal calcium absorption. *The Journal of nutrition*. 2004;134(11):3137-9. Epub 2004/10/30.
76. Sabbagh Y, O'Brien SP, Song W, Boulanger JH, Stockmann A, Arbeeny C, et al. Intestinal npt2b plays a major role in phosphate absorption and homeostasis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2009;20(11):2348-58. Epub 2009/09/05.
77. Lechner D, Kallay E, Cross HS. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 downregulates CYP27B1 and induces CYP24A1 in colon cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 2007;263(1-2):55-64. Epub 2006/10/13.
78. Cross HS, Nittke T, Kallay E. Colonic vitamin D metabolism: implications for the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Molecular and cellular endocrinology*. 2011;347(1-2):70-9. Epub 2011/08/02.
79. Cross HS, Kallay E. Regulation of the colonic vitamin D system for prevention of tumor progression: an update. *Future oncology (London, England)*. 2009;5(4):493-507. Epub 2009/05/20.
80. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;173(5):2909-12. Epub 2004/08/24.

81. Lagishetty V, Chun RF, Liu NQ, Lisse TS, Adams JS, Hewison M. 1 α -hydroxylase and innate immune responses to 25-hydroxyvitamin D in colonic cell lines. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010;121(1-2):228-33. Epub 2010/02/16.
82. Penna G, Adorini L. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;164(5):2405-11. Epub 2000/02/29.
83. Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;178(1):145-53. Epub 2006/12/22.
84. Peelen E, Knippenberg S, Muris AH, Thewissen M, Smolders J, Tervaert JW, et al. Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: a review. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(12):733-43. Epub 2011/05/31.
85. Hidaka M, Wakabayashi I, Takeda Y, Fukuzawa K. Vitamin D(3) derivatives increase soluble CD14 release through ERK1/2 activation and decrease IL-8 production in intestinal epithelial cells. *European journal of pharmacology*. 2013;721(1-3):305-12. Epub 2013/09/26.
86. Meeker S, Seamons A, Paik J, Treuting PM, Brabb T, Grady WM, et al. Increased dietary vitamin d suppresses MAPK signaling, colitis, and colon cancer. *Cancer research*. 2014;74(16):4398-408. Epub 2014/06/19.
87. Ding C, Wilding JP, Bing C. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ protects against macrophage-induced activation of NF κ B and MAPK signalling and chemokine release in human adipocytes. *PloS one*. 2013;8(4):e61707. Epub 2013/05/03.
88. Sen R, Smale ST. Selectivity of the NF- κ B response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(4):a000257. Epub 2010/05/11.
89. Zhang Y, Leung DY, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, et al. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;188(5):2127-35. Epub 2012/02/04.
90. Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology*. 2000;118(6):1001-11. Epub 2000/06/02.
91. Munkholm P, Langholz E, Hollander D, Thornberg K, Orholm M, Katz KD, et al. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis and their first degree relatives. *Gut*. 1994;35(1):68-72. Epub 1994/01/01.
92. Laukoetter MG, Bruewer M, Nusrat A. Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Current opinion in gastroenterology*. 2006;22(2):85-9. Epub 2006/02/08.
93. Lameris AL, Huybers S, Kaukinen K, Makela TH, Bindels RJ, Hoenderop JG, et al. Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2013;48(1):58-69. Epub 2012/12/05.
94. John LJ, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;15(5):1255-70. Epub 2011/02/08.
95. Al-Sadi R, Ye D, Said HM, Ma TY. Cellular and molecular mechanism of interleukin-1 β modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011;15(4):970-82. Epub 2010/04/22.

96. Kong J, Zhang Z, Musch MW, Ning G, Sun J, Hart J, et al. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2008;294(1):G208-16. Epub 2007/10/27.
97. Zhao H, Zhang H, Wu H, Li H, Liu L, Guo J, et al. Protective role of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ in the mucosal injury and epithelial barrier disruption in DSS-induced acute colitis in mice. *BMC gastroenterology*. 2012;12:57. Epub 2012/06/01.
98. De Lisle RC, Mueller R, Boyd M. Impaired mucosal barrier function in the small intestine of the cystic fibrosis mouse. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2011;53(4):371-9. Epub 2011/10/06.
99. Rovner AJ, Stallings VA, Schall JI, Leonard MB, Zemel BS. Vitamin D insufficiency in children, adolescents, and young adults with cystic fibrosis despite routine oral supplementation. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;86(6):1694-9. Epub 2007/12/11.
100. Chavasse RJ, Francis J, Balfour-Lynn I, Rosenthal M, Bush A. Serum vitamin D levels in children with cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*. 2004;38(2):119-22. Epub 2004/06/24.
101. Khazai NB, Judd SE, Jeng L, Wolfenden LL, Stecenko A, Ziegler TR, et al. Treatment and prevention of vitamin D insufficiency in cystic fibrosis patients: comparative efficacy of ergocalciferol, cholecalciferol, and UV light. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(6):2037-43. Epub 2009/04/02.
102. Sermet-Gaudelus I, Castanet M, Retsch-Bogart G, Aris RM. Update on cystic fibrosis-related bone disease: a special focus on children. *Paediatric respiratory reviews*. 2009;10(3):134-42. Epub 2009/08/05.
103. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science (New York, NY)*. 2006;311(5768):1770-3. Epub 2006/02/25.
104. Yim S, Dhawan P, Rangunath C, Christakos S, Diamond G. Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2007;6(6):403-10. Epub 2007/05/01.
105. Sitrin MD, Bissonnette M, Bolt MJ, Wali R, Khare S, Scaglione-Sewell B, et al. Rapid effects of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ on signal transduction systems in colonic cells. *Steroids*. 1999;64(1-2):137-42. Epub 1999/05/14.
106. Tong WM, Hofer H, Ellinger A, Peterlik M, Cross HS. Mechanism of antimitogenic action of vitamin D in human colon carcinoma cells: relevance for suppression of epidermal growth factor-stimulated cell growth. *Oncology research*. 1999;11(2):77-84. Epub 1999/09/17.
107. Maisonneuve P, Marshall BC, Knapp EA, Lowenfels AB. Cancer risk in cystic fibrosis: a 20-year nationwide study from the United States. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(2):122-9. Epub 2012/11/28.
108. Radlovic N. Cystic fibrosis. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*. 2012;140(3-4):244-9. Epub 2012/06/02.
109. Doring G. Mechanisms of airway inflammation in cystic fibrosis. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 1996;7(9 Suppl):63-6. Epub 1996/01/01.
110. Mailhot G. Vitamin D bioavailability in cystic fibrosis: a cause for concern? *Nutrition reviews*. 2012;70(5):280-93. Epub 2012/04/28.

111. Sun J. Vitamin D and mucosal immune function. *Current opinion in gastroenterology*. 2010;26(6):591-5. Epub 2010/07/20.
112. Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, Ploder M, Tamandl D, Friedl J, et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *European journal of immunology*. 2006;36(2):361-70. Epub 2006/01/13.
113. Levy E, Mehran M, Seidman E. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1995;9(8):626-35. Epub 1995/05/01.
114. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell biology and toxicology*. 2005;21(1):1-26. Epub 2005/05/04.
115. Perez A, Issler AC, Cotton CU, Kelley TJ, Verkman AS, Davis PB. CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;292(2):L383-95. Epub 2006/08/22.
116. Cuppoletti J, Chakrabarti J, Tewari KP, Malinowska DH. Differentiation between human ClC-2 and CFTR Cl⁻ channels with pharmacological agents. *American journal of physiology Cell physiology*. 2014;307(5):C479-92. Epub 2014/07/11.
117. Slater TF, Sawyer B, Strauli U. STUDIES ON SUCCINATE-TETRAZOLIUM REDUCTASE SYSTEMS. III. POINTS OF COUPLING OF FOUR DIFFERENT TETRAZOLIUM SALTS. *Biochimica et biophysica acta*. 1963;77:383-93. Epub 1963/11/08.
118. Mailhot G, Ravid Z, Barchi S, Moreau A, Rabasa-Lhoret R, Levy E. CFTR knockdown stimulates lipid synthesis and transport in intestinal Caco-2/15 cells. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2009;297(6):G1239-49. Epub 2009/10/08.
119. Mailhot G, Rabasa-Lhoret R, Moreau A, Berthiaume Y, Levy E. CFTR depletion results in changes in fatty acid composition and promotes lipogenesis in intestinal Caco 2/15 cells. *PloS one*. 2010;5(5):e10446. Epub 2010/05/14.
120. Fusunyan RD, Quinn JJ, Ohno Y, MacDermott RP, Sanderson IR. Butyrate enhances interleukin (IL)-8 secretion by intestinal epithelial cells in response to IL-1beta and lipopolysaccharide. *Pediatric research*. 1998;43(1):84-90. Epub 1998/02/12.
121. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *The Journal of clinical investigation*. 1989;84(4):1045-9. Epub 1989/10/01.
122. Jijon HB, Panenka WJ, Madsen KL, Parsons HG. MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism. *American journal of physiology Cell physiology*. 2002;283(1):C31-41. Epub 2002/06/11.
123. Holtmann H, Winzen R, Holland P, Eickemeier S, Hoffmann E, Wallach D, et al. Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(10):6742-53. Epub 1999/09/22.
124. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, et al. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*. 1998;115(2):357-69. Epub 1998/07/25.

125. Korhonen R, Moilanen E. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 as an inflammatory factor and drug target. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2014;114(1):24-36. Epub 2013/10/12.
126. Peng X, Tiwari N, Roy S, Yuan L, Murillo G, Mehta RR, et al. Regulation of CYP24 splicing by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in human colon cancer cells. *The Journal of endocrinology*. 2012;212(2):207-15. Epub 2011/11/10.
127. Rowling MJ, Gliniak C, Welsh J, Fleet JC. High dietary vitamin D prevents hypocalcemia and osteomalacia in CYP27B1 knockout mice. *The Journal of nutrition*. 2007;137(12):2608-15. Epub 2007/11/22.
128. Ooi JH, Li Y, Rogers CJ, Cantorna MT. Vitamin D regulates the gut microbiome and protects mice from dextran sodium sulfate-induced colitis. *The Journal of nutrition*. 2013;143(10):1679-86. Epub 2013/08/24.
129. Kim JH, Yamaori S, Tanabe T, Johnson CH, Krausz KW, Kato S, et al. Implication of intestinal VDR deficiency in inflammatory bowel disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830(1):2118-28. Epub 2012/10/09.
130. Tashiro K, Abe T, Oue N, Yasui W, Ryoji M. Characterization of vitamin D-mediated induction of the CYP 24 transcription. *Molecular and cellular endocrinology*. 2004;226(1-2):27-32. Epub 2004/10/19.
131. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*. 1977;59(1):221-6. Epub 1977/07/01.
132. Jumarie C, Malo C. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *Journal of cellular physiology*. 1991;149(1):24-33. Epub 1991/10/01.
133. Quan YS, Fujita T, Kamiyama F, Yamamoto A. Electrophysiological studies on the evaluation of absorption enhancers in Caco-2 cells using a microelectrode technique. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2000;23(6):738-42. Epub 2000/06/23.
134. Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiological reviews*. 1999;79(1 Suppl):S145-66. Epub 1999/01/29.
135. Kelly M, Trudel S, Brouillard F, Bouillaud F, Colas J, Nguyen-Khoa T, et al. Cystic fibrosis transmembrane regulator inhibitors CFTR(inh)-172 and GlyH-101 target mitochondrial functions, independently of chloride channel inhibition. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2010;333(1):60-9. Epub 2010/01/07.
136. Schenkel E, Atkins PC, Yost R, Zweiman B. Antigen-induced neutrophil chemotactic activity from sensitized lung. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1982;70(5):321-5. Epub 1982/11/01.
137. Kelley TJ, Drumm ML. Inducible nitric oxide synthase expression is reduced in cystic fibrosis murine and human airway epithelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(6):1200-7. Epub 1998/09/17.
138. Eckmann L, Jung HC, Schurer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology*. 1993;105(6):1689-97. Epub 1993/12/01.
139. Saadane A, Eastman J, Berger M, Bonfield TL. Parthenolide inhibits ERK and AP-1 which are dysregulated and contribute to excessive IL-8 expression and secretion in cystic fibrosis cells. *Journal of inflammation (London, England)*. 2011;8:26. Epub 2011/10/14.

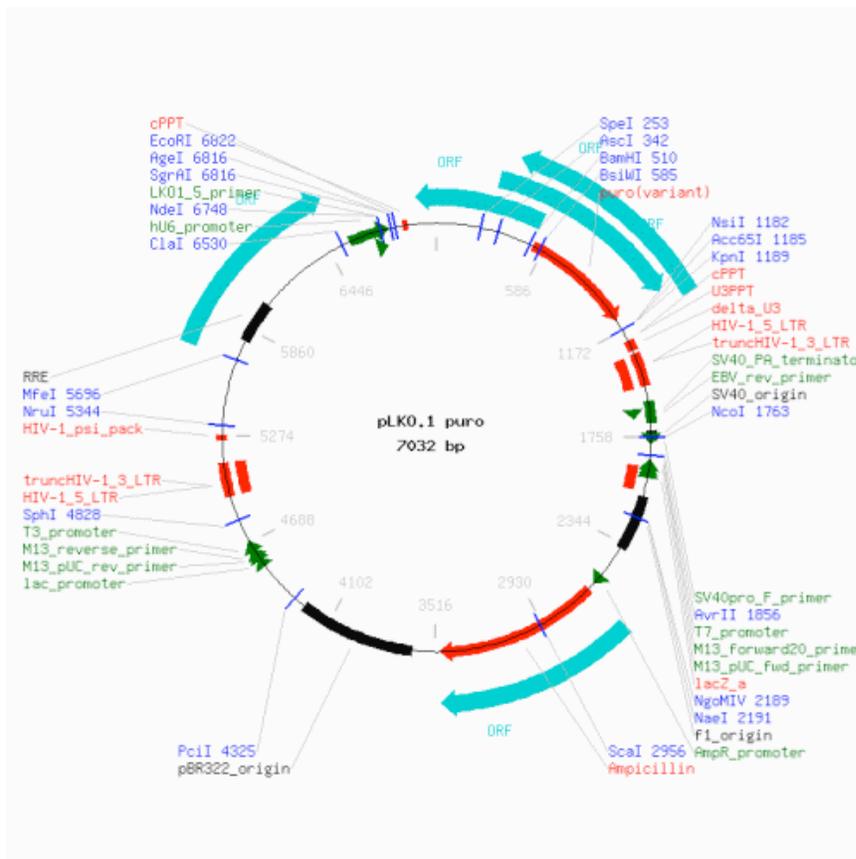
140. Stoeckle MY. Post-transcriptional regulation of gro alpha, beta, gamma, and IL-8 mRNAs by IL-1 beta. *Nucleic acids research*. 1991;19(4):917-20. Epub 1991/02/25.
141. Balakathiresan NS, Bhattacharyya S, Gutti U, Long RP, Jozwik C, Huang W, et al. Tristetraprolin regulates IL-8 mRNA stability in cystic fibrosis lung epithelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2009;296(6):L1012-8. Epub 2009/04/14.
142. Bhattacharyya S, Gutti U, Mercado J, Moore C, Pollard HB, Biswas R. MAPK signaling pathways regulate IL-8 mRNA stability and IL-8 protein expression in cystic fibrosis lung epithelial cell lines. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2011;300(1):L81-7. Epub 2010/10/19.
143. Berube J, Roussel L, Nattagh L, Rousseau S. Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function enhances activation of p38 and ERK MAPKs, increasing interleukin-6 synthesis in airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(29):22299-307. Epub 2010/05/13.
144. Parhar K, Ray A, Steinbrecher U, Nelson C, Salh B. The p38 mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-1beta-induced IL-8 expression via an effect on the IL-8 promoter in intestinal epithelial cells. *Immunology*. 2003;108(4):502-12. Epub 2003/04/02.
145. Roebuck KA. Regulation of interleukin-8 gene expression. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 1999;19(5):429-38. Epub 1999/07/01.
146. DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(11):2598-605. Epub 1998/06/17.
147. Eidelman O, Srivastava M, Zhang J, Leighton X, Murtie J, Jozwik C, et al. Control of the proinflammatory state in cystic fibrosis lung epithelial cells by genes from the TNF-alphaR/NFkappaB pathway. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2001;7(8):523-34. Epub 2001/10/10.
148. Vij N, Mazur S, Zeitlin PL. CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. *PloS one*. 2009;4(2):e4664. Epub 2009/02/28.
149. Hunter MJ, Treharne KJ, Winter AK, Cassidy DM, Land S, Mehta A. Expression of wild-type CFTR suppresses NF-kappaB-driven inflammatory signalling. *PloS one*. 2010;5(7):e11598. Epub 2010/07/21.
150. Weber AJ, Soong G, Bryan R, Saba S, Prince A. Activation of NF-kappaB in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl⁻ channel function. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001;281(1):L71-8. Epub 2001/06/19.
151. Joseph T, Look D, Ferkol T. NF-kappaB activation and sustained IL-8 gene expression in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelial cells stimulated with *Pseudomonas aeruginosa*. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2005;288(3):L471-9. Epub 2004/11/02.
152. Jilling T, Kirk KL. The biogenesis, traffic, and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *International review of cytology*. 1997;172:193-241. Epub 1997/01/01.
153. Hegedus T, Sessler T, Scott R, Thelin W, Bakos E, Varadi A, et al. C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;302(3):454-61. Epub 2003/03/05.

154. Moyer BD, Duhaime M, Shaw C, Denton J, Reynolds D, Karlson KH, et al. The PDZ-interacting domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is required for functional expression in the apical plasma membrane. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(35):27069-74. Epub 2000/06/15.
155. Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(31):21873-7. Epub 1999/07/27.
156. Xue ML, Zhu H, Thakur A, Willcox M. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human corneal epithelial cells colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunology and cell biology*. 2002;80(4):340-5. Epub 2002/07/18.
157. Equils O, Naiki Y, Shapiro AM, Michelsen K, Lu D, Adams J, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D inhibits lipopolysaccharide-induced immune activation in human endothelial cells. *Clinical and experimental immunology*. 2006;143(1):58-64. Epub 2005/12/22.
158. McNally P, Coughlan C, Bergsson G, Doyle M, Taggart C, Adorini L, et al. Vitamin D receptor agonists inhibit pro-inflammatory cytokine production from the respiratory epithelium in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2011;10(6):428-34. Epub 2011/07/26.
159. Di Rosa M, Malaguarnera G, De Gregorio C, Palumbo M, Nunnari G, Malaguarnera L. Immuno-modulatory effects of vitamin D3 in human monocyte and macrophages. *Cellular immunology*. 2012;280(1):36-43. Epub 2012/12/25.
160. Harant H, Andrew PJ, Reddy GS, Foglar E, Lindley IJ. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and a variety of its natural metabolites transcriptionally repress nuclear-factor-kappaB-mediated interleukin-8 gene expression. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1997;250(1):63-71. Epub 1998/02/07.
161. Nonn L, Peng L, Feldman D, Peehl DM. Inhibition of p38 by vitamin D reduces interleukin-6 production in normal prostate cells via mitogen-activated protein kinase phosphatase 5: implications for prostate cancer prevention by vitamin D. *Cancer research*. 2006;66(8):4516-24. Epub 2006/04/19.
162. Ravid A, Rubinstein E, Gamady A, Rotem C, Liberman UA, Koren R. Vitamin D inhibits the activation of stress-activated protein kinases by physiological and environmental stresses in keratinocytes. *The Journal of endocrinology*. 2002;173(3):525-32. Epub 2002/06/18.
163. Stio M, Martinesi M, Bruni S, Treves C, Mathieu C, Verstuyf A, et al. The Vitamin D analogue TX 527 blocks NF-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with Crohn's disease. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007;103(1):51-60. Epub 2006/10/20.
164. Suzuki Y, Ichiyama T, Ohsaki A, Hasegawa S, Shiraishi M, Furukawa S. Anti-inflammatory effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) in human coronary arterial endothelial cells: Implication for the treatment of Kawasaki disease. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2009;113(1-2):134-8. Epub 2009/01/14.
165. Chen Y, Zhang J, Ge X, Du J, Deb DK, Li YC. Vitamin D receptor inhibits nuclear factor kappaB activation by interacting with IkappaB kinase beta protein. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(27):19450-8. Epub 2013/05/15.

166. Kim S, Shevde NK, Pike JW. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates cyclic vitamin D receptor/retinoid X receptor DNA-binding, co-activator recruitment, and histone acetylation in intact osteoblasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2005;20(2):305-17. Epub 2005/01/14.
167. Valdivieso AG, Santa-Coloma TA. CFTR activity and mitochondrial function. *Redox biology*. 2013;1(1):190-202. Epub 2013/09/12.
168. Jacobs ET, Van Pelt C, Forster RE, Zaidi W, Hibler EA, Galligan MA, et al. CYP24A1 and CYP27B1 polymorphisms modulate vitamin D metabolism in colon cancer cells. *Cancer research*. 2013;73(8):2563-73. Epub 2013/02/21.
169. Froicu M, Weaver V, Wynn TA, McDowell MA, Welsh JE, Cantorna MT. A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2003;17(12):2386-92. Epub 2003/09/23.
170. Liu W, Chen Y, Golan MA, Annunziata ML, Du J, Dougherty U, et al. Intestinal epithelial vitamin D receptor signaling inhibits experimental colitis. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(9):3983-96. Epub 2013/08/16.
171. Coughlan CA, Chotirmall SH, Renwick J, Hassan T, Low TB, Bergsson G, et al. The effect of *Aspergillus fumigatus* infection on vitamin D receptor expression in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;186(10):999-1007. Epub 2012/08/21.
172. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*. 1989;96(3):736-49. Epub 1989/03/01.
173. Giuliano AR, Franceschi RT, Wood RJ. Characterization of the vitamin D receptor from the Caco-2 human colon carcinoma cell line: effect of cellular differentiation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1991;285(2):261-9. Epub 1991/03/01.
174. Tomon M, Tenenhouse HS, Jones G. Expression of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase activity in Caco-2 cells. An in vitro model of intestinal vitamin D catabolism. *Endocrinology*. 1990;126(6):2868-75. Epub 1990/06/01.
175. Kaefffer B. Mammalian intestinal epithelial cells in primary culture: a mini-review. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2002;38(3):123-34. Epub 2002/05/25.

Annexes

1.



Annexe 1. Nom du plasmide : pLKO.1 puro

Compagnie: Addgene Plasmid Repository

Type de plasmide : Vecteur d'expression mammalien, Lentiviral et ARNi,

Grandeur du plasmide : 7032 bp

Amorce pour séquençage : LKO.1 5'

Résistance à l'ampicilline

Pour plus d'information voir le lien : <http://www.addgene.org/8453>

Annexe 2.

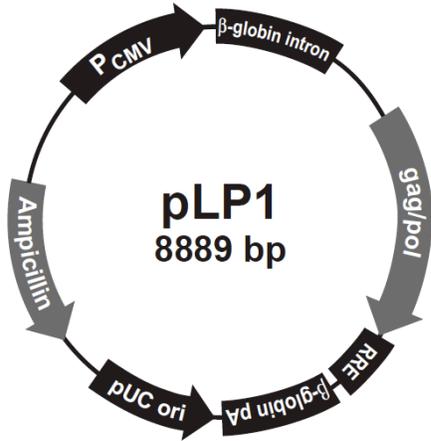


Figure 2.

Nom	Avantage
Human cytomégalo virus (CMV) promotor	Permet une expression de haut niveau des gènes <i>gag</i> et <i>pol</i> du VIH-1 dans les cellules mammifères.
Human β -globin intron	Augmente l'expression des gènes <i>gag</i> et <i>pol</i> dans les cellules mammifères.
HIV-1 <i>gag</i> coding sequence	Code pour les protéines virales du noyau pour former la structure du lentivirus
HIV-1 <i>pol</i> coding sequence	Code pour les enzymes de réplication de l'ADN viral pour la réplication et l'intégration de lentivirus.
HIV-1 Rev response élément (RRE)	Permet l'expression de Rev des gènes <i>gag</i> et <i>pol</i> .
Human β -globin polyadenylation signal	Permet l'arrêt de la transcription et de la polyadénylation de l'ADN messagère.
pUC origin of répllication (<i>ori</i>)	Permet la répllication dans E.coli.
Ampicillin (<i>bla</i>) résistance gene	Permet la sélection de plasmide dans E.coli.

Invitrogen, ViraPower™ Lentiviral Expression Systems. Catalog nos. K4950-00, K4960-00, K4975-00, K4980-00, K4985-00, K4990-00, K367-20, K370-20, and K371-20. Version G 14 April 2006, 25-0501.

Annexe 3.

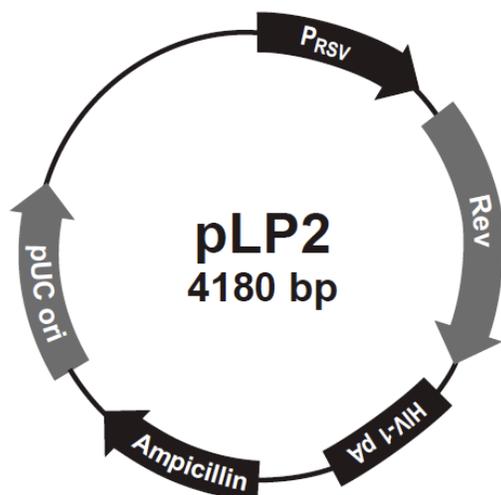


Figure 3.

Nom	Avantage
RSV enhancer / promoter	Permet un haut niveau d'expression pour le gène <i>rev</i> .
HIV-1 Rev ORF	Code pour la protéine Rev qui interagit avec RRE du plasmide pLP1 pour induire l'expression de Gag, Pol et le vecteur pLenti6/ V5 pour favoriser l'exportation nucléaire de l'ARN viral lors de empaquetage dans les particules virales.
HIV-1 LTR polyadenylation signal	Permet l'arrêt de la transcription et de la polyadénylation de l'ADN messagère.
Ampicillin (<i>bla</i>) résistance gene	Permet la sélection de plasmide dans E.coli.
pUC origin of répllication (<i>ori</i>)	Permet la répllication dans E.coli.

Invitrogen, ViraPower™ Lentiviral Expression Systems. Catalog nos. K4950-00, K4960-00, K4975-00, K4980-00, K4985-00, K4990-00, K367-20, K370-20, and K371-20. Version G 14 April 2006, 25-0501.

Annexe 4.

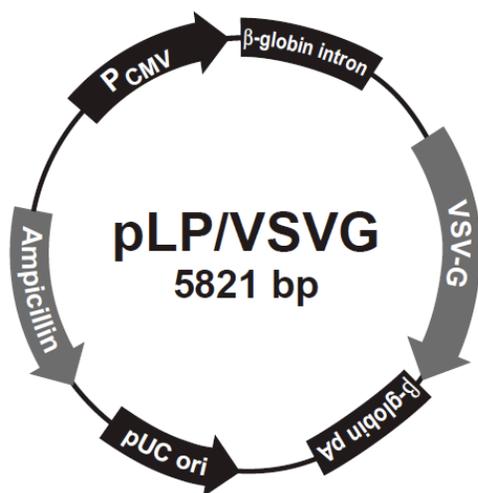


Figure 4.

Nom	Avantage
Human CMV promoter	Permet un haut niveau d'expression du gène VSV-G dans les cellules mammifères.
Human β-globin intron	Augmente l'expression du gène VSV-G dans les cellules mammifères.
VSV G glycoprotein (VSV-G)	Code pour la glycoprotéine G de l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) pour permettre la production d'un pseudo rétrovirus.
Human β-globin polyadenylation signal	Permet l'arrêt de la transcription et de la polyadénilation de l'ADN messagère.
pUC origin of répliation (<i>ori</i>)	Permet la répliation dans E.coli.
Ampicillin (<i>bla</i>) résistance gene	Permet la sélection de plasmide dans E.coli.

Invitrogen, ViraPower™ Lentiviral Expression Systems. Catalog nos. K4950-00, K4960-00, K4975-00, K4980-00, K4985-00, K4990-00, K367-20, K370-20, and K371-20. Version G 14 April 2006, 25-0501.