

Université de Montréal

**IMPACT DU STRESS OXYDANT ET DE
L'INFLAMMATION SUR LE MÉTABOLISME
INTESTINAL DES LIPIDES ET LES FONCTIONS
MITOCHONDRIALES DANS LA FIBROSE KYSTIQUE**

par Amanie Melaine Marie-Laure Kleme

Département Nutrition
Faculté de Médecine

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

Avril 2017

© Amanie Melaine Marie-Laure Kleme, 2017

Résumé

La Fibrose kystique (FK) ou mucoviscidose est une maladie monogénique létale qui touche avec prédilection les Caucasiens. Elle résulte de la mutation du gène *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (CFTR). Le déficit en acides gras essentiels (AGE) est classique et est associé à une malabsorption intestinale des lipides et vitamines liposolubles difficile à juguler. Le stress oxydant (SOx) et l'inflammation pourraient participer à la survenue de ces désordres lipidiques en impliquant la mitochondrie, organelle clé de l'homéostasie redox. L'hypothèse de ce travail est que le défaut du CFTR, associé à des perturbations oxydatives, inflammatoires et mitochondriales altère le métabolisme des lipides dans l'intestin des patients de la FK. Les objectifs spécifiques consistent à caractériser le profil oxydatif et inflammatoire, à évaluer les fonctions de la mitochondrie et à identifier les modulations du métabolisme des lipides/lipoprotéines dans l'intestin. À cette fin, les cellules épithéliales intestinales Caco-2/15 ont été invalidées pour le CFTR à l'aide du procédé de transfection innovateur Zinc Finger Nuclease, ce qui a permis de générer une lignée cellulaire *knockout* pour le CFTR (CFTR^{-/-}). Nos résultats démontrent la présence d'un profil oxydatif et inflammatoire en lien avec le défaut du CFTR. Les résultats témoignent de dysfonctions mitochondriales à type de dommages oxydatifs de l'ADN, de déféctuosité du métabolisme énergétique et de susceptibilité à l'apoptose, découlant probablement de la perturbation de l'activité du facteur de transcription PGC1 α régulateur par excellence de la biogénèse mitochondriale et de la transcription des éléments de réponse antioxydante. Le profil lipidique est en faveur d'une lipogénèse exagérée, d'une synthèse accrue de lipides, et de sécrétion amplifiée de lipoprotéines. Ces résultats démontrent clairement des dysfonctions de la mitochondrie en réponse à la délétion du CFTR, mais indiquent que les anomalies du transport lipidique, telles que décrites chez les patients de FK, ne découlent pas du défaut génique. Elles résulteraient surtout de l'intrication de divers facteurs tels que les anomalies du mucus, les modifications morphologiques de l'épithélium intestinal, l'insuffisance pancréatique et les perturbations du métabolisme des acides biliaires par le foie.

Mots-clés : Stress Oxydant, Inflammation, Intestin, mitochondrie, lipides, Fibrose Kystique

Summary

Cystic fibrosis (CF) is a lethal monogenic disease that predominantly affects Caucasians. It results from the mutation of the *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR)* gene. The deficiency in essential fatty acids (EFA) is classical and is associated with intestinal lipid and liposoluble vitamin malabsorption that is extremely difficult to control. Oxidative stress (OxS) and inflammation could participate in the occurrence of these lipid disorders by involving the mitochondria, a key organelle of redox homeostasis. The hypothesis of this work is that the deletion in the *CFTR* gene is associated with oxidative, inflammatory and mitochondrial perturbations, and alters intestinal lipid metabolism in CF. The specific objectives are to characterize the oxidative and inflammatory profile, to evaluate the functioning of mitochondria and to identify the modulation of lipid metabolism in the intestine. The *CFTR* gene deletion in Caco-2/15 intestinal epithelial cells was performed using the innovative Zinc Finger Nuclease transfection method, which allowed the generation of a *CFTR* (-/-) knockout cell line. Our results demonstrate the presence of an oxidative and inflammatory profile related to *CFTR* deficiency. Mitochondrial dysfunctions such as DNA oxidative damage, energy metabolism derangement and susceptibility to apoptosis are probably the result of the down-regulation of PGC1 α and NRF2 transcription factors, as they represent the dominant regulators of mitochondrial biogenesis and transcription of antioxidant response elements. The lipid profile is in favor of exaggerated lipogenesis, increased lipid synthesis and lipoprotein overproduction. These results underline mitochondrial dysfunction arising solely from the *CFTR* gene defect but, on the other hand, they suggest that the typical lipid transport abnormalities of CF patients result from the entanglement of various factors such as mucus abnormalities, morphological aberrations in the intestinal epithelium, exocrine pancreatic insufficiency and irregular liver bile acid metabolism.

Keywords : Oxidative Stress, Inflammation, Intestine, mitochondria, lipids, Cystic Fibrosis

Table des matières

Introduction.....	14
Fibrose Kystique.....	15
1.1 Généralités	15
1.2 Gène <i>CFTR</i>	17
1.2.1 Description.....	17
1.2.2 Mutations géniques.....	18
1.3 Protéine CFTR	20
1.3.1 Synthèse et Anatomie	20
1.3.2 Fonctions des transporteurs de la famille ATP Binding Cassette.....	21
1.4 Symptomatologie clinique	23
1.4.1 Manifestations digestives.....	23
1.4.2 Manifestations respiratoires.....	25
1.4.3 Autres symptômes.....	27
1.5 Déséquilibre en acides gras essentiels et déficience en vitamines liposolubles	27
1.5.1 Déséquilibre en acides gras essentiels	27
1.5.2 Déficience en vitamines liposolubles.....	28
1.6 Physiopathologie.....	29
1.6.1 Théorie des troubles hydro-électrolytiques.....	29
1.6.2 Théorie du déséquilibre en acides gras essentiels.....	30
1.6.3 Théorie du SOx et de l'inflammation	31
1.7 Diagnostic de la FK	32
1.8 Traitement de la FK	35
1.8.1 Traitement symptomatique	35
1.8.2 Thérapie génique.....	36
1.8.3 Réparateurs de l'ARNm.....	37
1.8.4 Trans-lecteurs.....	37
1.8.5 Traitement médicamenteux.....	37
2 Stress Oxydant	39

2.1	Acteurs du stress oxydant	40
2.1.1	Pro-oxydants	40
2.1.2	Défense antioxydante.....	46
2.2	SOx <i>versus</i> stress du réticulum endoplasmique dans la FK	51
2.3	SOx dans l'intestin de FK.....	52
2.3.1	Sources potentielles	52
2.3.2	Défense antioxydante de l'intestin.....	53
2.3.3	Thérapie antioxydante.....	55
3	Inflammation.....	57
3.1	Médiateurs de l'inflammation.....	58
3.1.1	Médiateurs cellulaires	58
3.1.2	Systèmes d'activation plasmatique.....	62
3.2	Facteurs de transcription de l'inflammation	63
3.2.1	Nuclear factor kappa B (NF- κ B)	63
3.2.2	Activator protein -1 (AP-1).....	66
3.3	Inflammation dans la fibrose kystique.....	68
3.3.1	Mécanismes étiologiques	68
3.3.2	Caractéristiques.....	71
4	Mitochondrie.....	71
4.1	Anatomie descriptive	71
4.2	Biogénèse mitochondriale : rôle de PGC-1 α	74
4.3	Dynamique mitochondriale.....	76
4.3.1	Dynamique de forme des mitochondries	77
4.3.2	Dynamique de la distribution cellulaire des mitochondries.....	79
4.3.3	Dynamique de la membrane mitochondriale interne	80
4.3.4	Dynamique mitochondriale et efficacité énergétique	80
4.4	Fonctions mitochondriales.....	81
4.4.1	β -oxydation.....	81
4.4.2	Phosphorylation oxydative.....	83
4.4.3	Apoptose	88

4.4.4	Rétention calcique.....	91
4.5	Caractéristiques mitochondriales dans la fibrose kystique	93
5	Métabolisme intestinal des lipides	94
5.1	Intestin grêle.....	94
5.1.1	Caractéristiques anatomiques.....	94
5.1.2	Structure histologique	95
5.1.3	Physiologie.....	97
5.2	Gros intestin ou colon	98
5.2.1	Caractéristiques anatomiques.....	98
5.2.2	Structure histologique	98
5.2.3	Physiologie.....	98
5.3	Métabolisme des lipides.....	99
5.3.1	Digestion	99
5.3.2	Absorption.....	100
5.3.3	Formation des lipoprotéines.....	101
5.4	Modulation du métabolisme intestinal des lipides dans la FK	105
5.4.1	Phase endoluminale	105
5.4.2	Phase entérocytaire	106
5.4.3	Facteurs extra-intestinaux	109
	Objectifs de la recherche.....	113
	Résultats	115
	Article 1	116
	Article 2	167
	Article 3	191
	Discussion et conclusion.....	217
	Perspectives.....	222
	Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Tableau I.	Caractéristiques phénotypiques de la Fibrose kystique	33
Tableau II.	Indications thérapeutiques dans la Fibrose kystique	39
Tableau III.	Fonctions mitochondriales	77

Liste des figures

Figure 1.	Classes de mutations géniques du <i>CFTR</i>	19
Figure 2.	Représentation de la protéine CFTR	22
Figure 3.	Principaux sites de production des ROS.....	43
Figure 4.	Induction de la réponse antioxydante par Nrf2	48
Figure 5.	Mode d'action des principaux antioxydants	50
Figure 6.	Voies d'activation de NF- κ B	65
Figure 7.	Régulation transcriptionnelle de NF- κ B.....	66
Figure 8.	Anatomie de la mitochondrie.....	72
Figure 9.	Transporteurs membranaires de la mitochondrie.....	73
Figure 10.	PGC-1 α et les facteurs de transcription des fonctions mitochondriales....	76
Figure 11.	Dynamique de forme des mitochondries.....	79
Figure 12.	Représentation de la mort cellulaire par apoptose et par nécrose	89
Figure 13.	Anomalies mitochondriales dans la FK	94
Figure 14.	Biosynthèse des chylomicrons.....	103
Figure 15.	Facteurs modulant le métabolisme intestinal des lipides dans la FK.....	111

Liste des sigles

AA = acide arachidonique

ADN = acide désoxyribonucléique

ADP = adénosine diphosphate

AG = acides gras

AGE = acides gras essentiels

AGL = acides gras libres

AGPI = acides gras polyinsaturés

AIF = apoptosis inducing factor (facteur inducteur d'apoptose)

AP-1 = activator protein -1 (protéine activatrice-1)

ARN = acide ribonucléique

ATP = adénosine triphosphate

cAMP = cyclic adenosine monophosphate (adénosine monophosphate cyclique)

CAT = catalase

CE = cholesterol ester (ester de cholestérol)

CFTR = cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CI = complexe I

CII = complexe II

CIII = complexe III

CIV = complexe IV

CM = chylomicrons

CoQ10 = coenzyme Q10

COX = cyclooxygénase

COX-2 = cyclooxygénase 2

CPT1 = carnitine palmitoyl transférase 1

CV = complexe V

CyS/CySS = cystéine/cystine

DHA = docosahexaenoic acid (acide docosahexaénoïque)

ENAC = epithelial sodium channel (canal épithélial à sodium)

EPA = eicosapentaenoic acid (acide éicosapentaénoïque)
ERA = éléments de réponse antioxydant
ERR = estrogen related receptor (récepteur des oestrogènes)
ETF = electron-transferring flavoprotein (flavoprotéine de transfert d'électrons)
ETF-QOR = electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxydoreductase
FAD = flavine adénine dinucléotide
FK = fibrose kystique
FMN = flavine mononucléotide
GPx = glutathion peroxydase
GRx = glutathion réductase
GSH = glutathion
GSH/GSSG = glutathion/ disulfure de glutathion
H₂O₂ = peroxyde d'hydrogène
HDL = high density lipoprotein (lipoprotéine de haute densité)
I-κB = inhibiteur-kappa B
IFN = interféron
IKK = I-κB kinase
IL = interleukine
IL-6 = interleukine 6
IMC = indice de masse corporelle
Keap1 = kelch like ECH associated protein 1
LA = linoleic acid (acide linoléique)
LCAD = long chain acyl-CoA dehydrogenase (acyl-CoA déshydrogénase à chaîne longue)
LCFA = long chain fatty acid (acide gras à chaîne longue)
LDL = low density lipoprotein (lipoprotéine de basse densité)
LOX = lipooxygénase
LT = leucotriènes
mtDNA = mitochondrial DNA
NADH = nicotinamide adénine dinucléotide
NBD1 = nucleotide-binding domain 1 (domaine de liaison nucléotidique 1)

NBD2 = nucleotide-binding domain 2 (domaine de liaison nucléotidique 2)
NF- κ B = nuclear factor-kappa B (facteur nucléaire-kappa B)
NO = monoxyde d'azote
NOX = NADPH oxydase
Nrf2 = nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2
O₂ = oxygène
O₂⁻ = anion superoxyde
OH[•] = radical hydroxyl
ORCC = outwardly rectified chloride channel (canal chlore à rectification sortante)
PG = prostaglandine
PGC1- α = peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PL = phospholipides
PLA2 = phospholipase A2
PPAR = peroxisome proliferator-activated receptor
RE = réticulum endoplasmique
ROS = reactive oxygen species (espèces réactives d'oxygène)
SCFA = short chain fatty acid (acide gras à chaîne courte)
SOD = superoxyde dismutase
SOx = stress oxydant
TG = triglycérides
TNF- α = tumor necrosis factor alpha (facteur de nécrose tumorale alpha)
Trx(SH)₂/ Trx-SS = thioredoxine/thioredoxine oxydée
VLDL = very low density lipoprotein (lipoprotéine de très faible densité)

Dédicaces

À l'Éternel, mon DIEU

Merci Seigneur d'avoir renouvelé mes forces chaque matin durant ces années de doctorat. Reçois la *RECONNAISSANCE* de mon cœur. Merci de me montrer le chemin à suivre à chacune des étapes de ma vie. Tu es celui qui ouvre toute porte et qui bénit au delà de nos espérances. Ma vie est un témoignage de ta bonté infinie.

À mon époux André et à mes filles Sarah, Myriam & Raïssa

Les mots ne suffiront jamais... votre amour, votre soutien et surtout votre compréhension quand « maman s'enferme au bureau et qu'elle ne veut pas être dérangée ». Merci de m'avoir accompagnée dans la réalisation de ce grand projet qui nous a conduit au Canada.

À mes parents Kleme Célestin & Kleme Émilie, mes frères Serge et Hervé

Vous m'avez manqué tous les jours. Merci d'être une Famille hors du commun.

À Marie-Claude Felemou et à sa famille

Merci pour votre disponibilité, votre gentillesse, votre soutien fraternel.

À Jocelyne et à sa famille

Merci pour vos encouragements.

À mes cousins : Sylvie, Hubert et Nathalie

Merci pour tout ce que nous avons partagé durant ces dernières années.

À Franceska

Merci d'être la petite sœur efficace !

Remerciements

Mes remerciements vont à l'endroit de :

Pr Émile Levy

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire. Vos encouragements à travailler sur cette thématique que je connaissais peu au départ m'ont conduite à adopter mon sujet. J'ai appris énormément de la recherche et je suis satisfaite d'avoir ajouté cette corde à mon arc. Merci pour TOUT.

Dr Alain Sané

Merci « doc » pour tout : ta bonne humeur, les histoires rocambolesques, ton soutien, tes encouragements ...trop de choses que je pourrai dire. Ce doctorat a été une belle occasion de te connaître et je reste marquée par le souvenir.

Dr Thierry Ntimbane

La première fois que je suis venue au laboratoire, tu m'as cédé ton siège...je m'en souviendrai toujours. Merci pour tes encouragements.

Carole Garofalo

Tu as « guidé mes pas » dans l'apprentissage des techniques de laboratoire. Merci pour ta patience, tes encouragements, ton sourire. Je n'oublierai jamais !

Zola « Madame Spahis »

Merci pour la disponibilité dont tu as fait preuve pour m'accompagner dans « ces fameuses soumissions d'articles ». Ton expérience dans le domaine m'a été d'un grand recours.

Notre « Lab. Team »

Sophia, Pantéa, Maryse, Jade, Véronique, Nicholas, Marc André. Je vous remercie pour votre soutien et votre disponibilité au quotidien.

Marie-Claude Denis, Sabrina Yara et Sylvain Mayer : merci pour tout...

Introduction

Les désordres lipidiques de la fibrose kystique (FK) sont classiques, et les différentes stratégies déployées en vue de leur correction sont restées pour la plupart sans succès patent. La persistance de la stéatorrhée et du déséquilibre en acides gras essentiels (AGE), chez les patients sévèrement atteints, entretient constamment le risque de dénutrition, de carence en vitamines liposolubles ainsi que le corolaire de leurs complications. La difficulté de mettre un terme à ces désordres a suscité des investigations approfondies en vue d'élucider les mécanismes physiopathologiques en cause. Le stress oxydant et l'inflammation sont alors récemment apparus comme étant des acteurs physiopathologiques majeurs dont les marqueurs ont été identifiés à un stade précoce de la vie et notamment dans les voies respiratoires. Leur lien direct avec le défaut génique est de plus en plus admis. L'intestin, organe clé du métabolisme des lipides a cependant été peu exploré en dehors de l'évidence de l'existence d'une malabsorption. Pourtant, plusieurs facteurs intriqués contribuent à augmenter sa susceptibilité au stress oxydant (SOx) et à l'inflammation dans ce contexte. Un nombre restreint d'études ont rapporté des anomalies de la synthèse et de la sécrétion des lipoprotéines révélant ainsi des perturbations potentielles de la phase entérocytaire du métabolisme lipidique. Le SOx et l'inflammation, acteurs intimement liés, pourraient altérer significativement le métabolisme intestinal des lipides en interférant avec la phase entérocytaire. Leur contribution à la genèse des désordres lipidiques pourrait également impliquer la mitochondrie, organelle clé de l'homéostasie redox qui abrite les processus de β -oxydation des acides gras et de phosphorylation oxydative. C'est justement le sujet de mon programme de recherche que j'ai traité durant mes études doctorales.

Fibrose Kystique

1.1 Généralités

La FK, encore appelée mucoviscidose, est considérée comme la maladie génétique la plus fréquente et la plus létale chez les Caucasiens (Ravilly, Roux, Bellis, & Dufour, 2007). La terminologie de « fibrose kystique » est utilisée en référence aux kystes et au tissu fibreux présents dans le pancréas tandis que le terme de « mucoviscidose » fait allusion à la présence de mucus épais et visqueux dans divers canaux glandulaires. La FK résulte d'une mutation du gène *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)* localisé sur le bras long du chromosome 7 (Storni, Claustres, Chinet, & Ravilly, 2001). Ce gène code pour la protéine du même nom, située au pôle apical des cellules épithéliales exocrines, d'où elle exerce des fonctions multiples (Naruse, 2002). En effet, son rôle majeur dans l'équilibre hydro-électrolytique des sécrétions glandulaires exocrines de même que dans la défense antioxydante est connu (Galli et al., 2012; Wine, 2001). La FK se transmet sous un mode autosomique et récessif non lié au sexe (Lowe, May, & Reed, 1949). Aussi, les manifestations cliniques sont-elles l'apanage des sujets homozygotes. Sa prévalence est estimée à 1/2500 naissances vivantes en Europe et en Amérique du Nord (Durieu & Josserand, 2008). Au Canada, selon la fondation de la FK, cette prévalence est de 1/3600 et le 1/25ème de la population serait porteur d'une défectuosité du gène *CFTR* (Canada, 2017). La FK est rare chez les sujets de race noire (1/15000) et l'est davantage chez les asiatiques (1/31000) (Hamosh et al., 1998). La définition classique qu'on lui attribue est celle d'une « maladie pulmonaire obstructive chronique accompagnée d'une insuffisance pancréatique exocrine et d'une élévation de la concentration de sodium et de chlore dans la sueur » (Verhaege, 2007). Cette définition met en exergue les symptômes qu'on retrouve en avant du tableau clinique sans toutefois être évocatrice du caractère hautement multisystémique de la pathologie. Le déficit en AGE est caractéristique de la FK et a longtemps été considéré comme la plaque tournante des désordres rapportés, jusqu'à la découverte du gène en cause. Sa physiopathologie n'est pas totalement élucidée au terme de plusieurs décennies de recherche. Dans les années qui ont suivi la découverte de la FK, l'espérance de vie était très brève. En effet, la majeure partie des patients décédaient avant la deuxième année de vie (Andersen, 1938). Ces dernières années, l'amélioration de la prise en

charge a nettement augmenté le nombre d'années de vie des patients qui pour certains vivent jusqu'à 40 voire 50 ans (Durieu & Josserand, 2008). L'âge moyen des patients canadiens est de 21,4 ans et l'âge moyen de survie est estimé à 50,9 ans (Canada, 2013). Comme mentionné, la compréhension de la physiopathologie de la FK est encore partielle, alors que son bénéfice dans l'amélioration de la prise en charge des patients est sans équivoque. Plusieurs hypothèses ont été émises afin de l'élucider. Elles sont relatives aux troubles hydro électrolytiques, aux troubles du métabolisme des acides gras (AG), au SOx et à l'inflammation (Chanson, 2009; Lenoir, Sermet, & Duhamel, 2001). Ces processus apparaissent davantage intriqués qu'isolés étant donné qu'aucun ne justifie à lui seul l'éventail des désordres rapportés. L'implication du SOx et de l'inflammation a été récemment admise contrairement aux autres mécanismes, décrits bien avant la découverte du gène. En effet, la présence de leurs marqueurs, en dehors de tout contexte infectieux et à un stade précoce de la vie a révolutionné l'intérêt qui leur était accordé dans la FK. Le recours aux antioxydants est alors apparu comme solution idoine aux diverses anomalies. Cependant, l'inconstance des résultats des études d'intervention n'a pas permis de tirer des conclusions définitives. Cet état de fait a suscité des interrogations quant aux processus de genèse et d'entretien du SOx et de l'inflammation dans la FK.

La FK a initialement été rapportée en 1936 par le Dr Guido Fanconi (di Sant'Agnesse & Talamo, 1967). En 1938, le Dr Dorothy Andersen procède aux premières descriptions cliniques de la maladie. Elle mentionne que les décès enregistrés au cours de la première semaine de vie surviennent dans un contexte de signes d'appel digestifs notamment d'iléus méconial tandis que le retard de gain pondéral et les signes pulmonaires prédominent chez les nourrissons (Andersen, 1938). Les autopsies permettent la description post-mortem des lésions anatomo-pathologiques associées. La désorganisation du pancréas résultant de la présence de kystes, de fibrose, de même que de sténose ou d'atrésie des canaux de Wirsung et de Santorini est clairement rapportée (Andersen, 1938). La distinction entre la FK et les autres troubles de l'absorption intestinale, notamment la maladie cœliaque, est alors établie.

La découverte d'anomalies dans la composition en électrolytes de la sueur se fait quelques années plus tard en 1953 par le Dr Paul di Sant'Agnesse. Il rapporte l'existence d'une teneur en chlore et en sodium de 2 à 4 fois la normale dans la sueur des sujets atteints de FK, d'où le terme de « sueur salée ». La teneur en potassium est aussi élevée mais à un moindre degré (di Sant'Agnesse, DARLING, Perera, & Shea, 1953). L'analyse de la sueur avait été motivée par le

constat d'une plus grande vulnérabilité des patients de FK à la vague de chaleur qui a frappé New York en 1948. Les travaux de Quinton publiés en 1983 ont permis une meilleure compréhension des mécanismes en amont de cette anomalie de la sueur. En effet, ses études, menées sur des conduits sudoripares isolés révélaient une faible perméabilité des conduits de FK au chlore conduisant à une faible réabsorption du chlorure de sodium dont les concentrations sont élevées dans la sueur (P. M. Quinton, 1983). Il conclut en suggérant que la FK découlerait de la défectuosité d'un canal chlore. La fonctionnalité première de la protéine CFTR était ainsi déterminée.

L'année 1989 marque un tournant décisif dans l'histoire de la pathologie par la découverte du gène *CFTR* (Storni et al., 2001). La nature monogénique de la FK suggérée 50 ans plus tôt par Lowe est alors confirmée (Lowe et al., 1949). Cette découverte a donné un regain d'espoir quant à la possibilité d'un traitement curatif. Cependant, la thérapie génique expérimentée dès 1992 s'est heurtée à la complexité de la maladie et a abouti à des résultats peu probants. Le choix du vecteur, la pluralité des gènes modulateurs, la focalisation expérimentale sur l'arbre respiratoire au détriment des autres systèmes mais surtout la méconnaissance du rôle fonctionnel exact de la protéine, ont contribué à cet échec (Cottier & Guerry, 2000).

1.2 Gène *CFTR*

1.2.1 Description

Le gène *CFTR* dont la mutation est à l'origine de la FK est situé sur le bras long du chromosome 7. Il comprend 25kb repartis en 27 exons. L'ARNm messager qui résulte de sa transcription comprend 6500 paires de base et est retrouvé dans les épithélia sécrétoires touchés par la FK (Verhaege, 2007). Dans les conditions physiologiques, lorsque le brin d'ARN messager (ARNm) transcrit sort du noyau, il est traduit au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Durant cette étape de traduction, débute le processus de repliement de la protéine naissante pour parvenir à une structure tertiaire complexe. La protéine naissante qui sort du RE atteindra sa maturation au niveau de l'appareil de Golgi et sera ensuite transportée à la membrane apicale de la cellule. Là, elle joue un rôle central dans les échanges hydro-électrolytiques transmembranaires par une répétition de cycles d'ouverture et de fermeture canaux (Bosch & De Boeck, 2016).

1.2.2 Mutations géniques

Depuis sa découverte en 1989, le gène *CFTR* a fait l'objet de diverses études ayant permis l'identification d'environ 2000 mutations dont seules les caractéristiques fonctionnelles d'un petit nombre sont connues à ce jour (Canada, 2013). Ces mutations ont été réparties en 6 classes selon le stade de développement et les caractéristiques fonctionnelles de la protéine (Haardt, Benharouga, Lechardeur, Kartner, & Lukacs, 1999; Ntimbane et al., 2009; Pilewski & Frizzell, 1999)(Figure 1).

Les mutations de classe I correspondent à un défaut de synthèse de la protéine, résultant de la transcription d'un ARNm tronqué, qui ne peut être traduit par le RE. Le défaut de l'ARNm peut résulter d'un codon stop prématuré, d'un nonsense (18%), de délétions ou d'insertions hors du cadre de lecture (22%) ou encore d'un épissage aberrant (Ex G542X, W1282X).

Les mutations de classe II correspondent à un défaut de maturation de la protéine. La protéine mal repliée est retenue dans le RE ou en sort pour être immédiatement détruite par le protéasome avant d'atteindre l'appareil de Golgi. Ces mutations résultent d'un non-sens ou d'une délétion d'acides aminés. (Ex p.Phe508del nommée au préalable $\Delta F508$, N1303K, 1507del).

Les mutations de classe III se caractérisent par un défaut de régulation de la protéine qui parvient au pôle apical de la cellule, sans toutefois être activable par la protéine kinase A (PKA). Il s'agit de mutations non-sens (Ex G551D).

Les mutations de classe IV se traduisent par une baisse de la conductance du canal CFTR (Ex R347P).

Les mutations de classe V aboutissent à une réduction du nombre de protéines CFTR au pôle apical. Ceci du fait de l'épissage incorrect d'un nombre d'ARNm transcrits (Ex 3849 + 10 kb C to T).

Les mutations de classe VI se caractérisent par une accélération du recyclage de la protéine du fait de la troncature de l'extrémité c terminale. Dans cette classe, la protéine CFTR est peu stable (Haardt et al., 1999).

Les classes I, II et III sont considérées comme des mutations sévères tandis que les classes IV V et VI sont dites modérées. La mutation la plus sévère décrite à ce jour est la p.Phe508del précédemment appelée $\Delta F508$. Elle correspond à une délétion de trois paires de base nucléotidiques (CTT) aboutissant ainsi à la perte de la phénylalanine en position 508. Cette

délétion est présente chez plus de 70% des patients de FK dans la population caucasienne (Rowe, Miller, & Sorscher, 2005). On estime également que plus de 90% des patients de FK possèdent au moins une allèle $\Delta F508$ (Kopito, 1999). La fréquence élevée de cette mutation résulterait d'une dérive génétique (Verhaege, 2007). L'allèle $\Delta F508$ code pour une protéine mal repliée et instable totalement absente de la membrane plasmique (Kopito, 1999). Les anomalies du repliement et du traitement biosynthétique de la protéine CFTR naissante, au sein du RE, sont incriminées dans 2/3 des cas cliniques de FK (Ntimbane et al., 2009). La relation génotype-phénotype est en général complexe dans la FK. Cependant, il existe des possibilités de prédiction assez précises de la fonction du pancréas, des glandes sudoripares et des organes génitaux à partir du génotype (Ravilly et al., 2007). En effet, il a été démontré que les caractéristiques fonctionnelles du pancréas reflètent le degré de sévérité de la mutation génique. Ainsi, dans les mutations modérées, on note un haut niveau de conservation de l'activité résiduelle du pancréas tandis que les patients porteurs de mutations sévères ont une perte considérable de la fonctionnalité pancréatique. Le lien entre le type de mutation et la gravité de la pathologie clinique est aussi établi en fonction du pourcentage de protéines CFTR fonctionnelles (Kristidis et al., 1992). Ainsi, des pertes en deçà de 10% de la normale sont marquées par une atteinte des organes génitaux tandis que les fonctions pulmonaires et sudoripares s'altèrent en dessous de 5%. Enfin, l'insuffisance pancréatique survient pour un taux de protéines fonctionnelles inférieur à 1% (Pilewski & Frizzell, 1999).

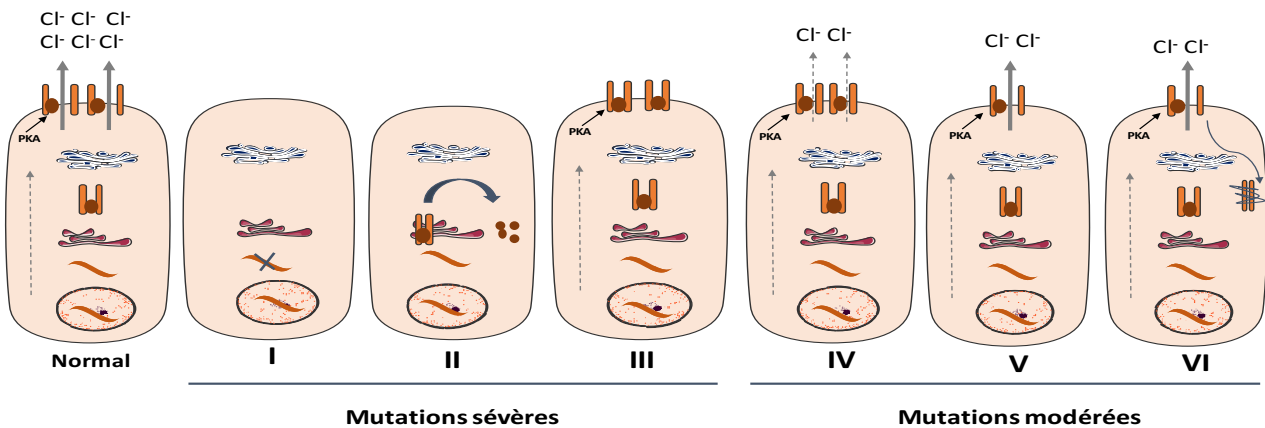


Figure 1. Classes de mutations géniques du *CFTR*

I : défaut de synthèse, II : défaut de maturation, III : défaut de régulation canalairé,
 IV : défaut de conductance, V : faible expression protéique, VI : instabilité protéique.

1.3 Protéine CFTR

1.3.1 Synthèse et Anatomie

La synthèse de la protéine CFTR débute au niveau du RE sous forme d'un précurseur immature à noyau glycosylé de 140 kDa. Ce dernier est associé à une protéine de choc thermique cytoplasmique (70kDa) et à la calnexine de la protéine de liaison calcique du RE (90kDa). Ces deux protéines chaperonnes interviennent dans le mécanisme de repliement de la protéine tout en prévenant l'accumulation des protéines dans le RE (Kopito, 1999).

La protéine CFTR mature est constituée de 1480 acides aminés et son poids moléculaire est de 170-180 kDa. Elle se compose de 5 domaines : 2 domaines transmembranaires hydrophobes (TMD1 et TMD2), constitués chacun de 6 hélices, forment le pore du canal ; 2 domaines intracellulaires de liaison nucléotidiques hydrophiles (NBD1 et NBD2) qui sont des domaines de liaison à l'ATP et 1 domaine intracellulaire de régulation (domaine R) qui relie les deux moitiés de la protéine. Ce domaine présente de nombreux résidus chargés ainsi que plusieurs sites de phosphorylation, substrats de certaines protéines kinases telles que PKA et la PKC. La protéine possède également deux extrémités terminales cytoplasmiques dont une aminée (N) et l'autre carboxyle (C) (C. Li & Naren, 2010). NBD2 est relié à l'extrémité C terminale où existe un domaine de liaison protéique appelé PDZ (PSD95, Dlg, ZO-1) (Figure 2). C'est à ce niveau que le CFTR interagit avec les protéines impliquées dans son repliement et son transfert de l'appareil de Golgi à la membrane apicale. Il s'agit en l'occurrence de la protéine CAL (*CFTR associated Ligand*) mais aussi d'une centaine de protéines chaperonnes ou co-chaperonnes (Wang et al., 2006). La protéine CFTR interagit également avec d'autres protéines possédant un domaine PDZ et qui vont lui assurer une stabilité à la membrane apicale à travers la formation d'un complexe macromoléculaire. Ces protéines sont NHERF1 et 2 (*sodium-proton exchange regulatory factor*) et CAP 70 (*CFTR associated Protein 70*)(Guggino, 2004) . La localisation élective de la protéine CFTR à la membrane apicale des épithélia sécrétoires justifie sa présence dans divers organes tels que les bronches, les glandes sudoripares, les sinus, la thyroïde, les organes reproducteurs, le foie et la vésicule biliaire, le pancréas, l'intestin et autres systèmes.

1.3.2 Fonctions des transporteurs de la famille ATP Binding Cassette

La protéine CFTR tout en étant un canal ionique, appartient à la grande famille des transporteurs à ATP Binding Cassette. Cette dernière regroupe des protéines spécialisées dans le transport transmembranaire d'une grande variété de substrats tels que les sucres, les protéines, les métaux et les médicaments (Gadsby, Vergani, & Csanady, 2006). L'appartenance de CFTR à cette famille lui confère un mode d'activation différent de celui des autres canaux ioniques. Tandis que les autres processus d'activation résultent de la liaison d'un ligand ou d'une modulation du courant électrique, l'activation de la fonction canalaire du CFTR est AMP cyclique (AMPC) dépendante (Figure 2). En effet, dans les conditions physiologiques, l'augmentation du taux intracellulaire d'AMPC stimule la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle le domaine R. Il s'en suit une liaison de molécules d'ATP au niveau des domaines nucléotidiques. Cette liaison induit le rapprochement de NBD1 et NBD2 ainsi que la transmission d'un signal aux domaines transmembranaires. Des changements de conformation s'en suivent pour permettre l'ouverture du canal chlore. L'hydrolyse de l'ATP sur le domaine NBD2 conduit à une interruption de la liaison NBD1-NBD2 et aboutit à la fermeture du canal. Le transport actif d'ion chlorure du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire est accompagné d'un transport passif d'eau. Ces mouvements ioniques et hydriques assurent la fluidité des sécrétions dans les glandes épithéliales exocrines (Zhou et al., 2006). La protéine CFTR apparait donc comme le régulateur par excellence de la viscosité du mucus. Aussi, l'efficacité de la fonction mucociliaire dans les voies aériennes dépend-elle de la fonctionnalité du CFTR, du nombre et de la stabilité des protéines à la membrane apicale (Bosch & De Boeck, 2016).

Dans le contexte de la FK, la défektivité de la protéine s'accompagne d'une entrée massive de sodium, d'une rétention de chlore et d'eau dans la cellule conduisant à l'épaississement et à la viscosité des sécrétions glandulaires. Ces modifications de consistance résultent en partie, de la perturbation de l'interaction du CFTR avec les autres canaux transmembranaires, situés à la membrane apicale, et intervenant dans l'équilibre hydro-électrolytique. En effet, dans un contexte de fonctionnement optimal, la protéine CFTR inhibe le canal sodium à rectification entrante (ENAC) et le canal chlore calcium (ClCa) tout en optimisant l'activité du canal chlore à rectification sortante (ORCC). Elle régule également les aquaporines, les échangeurs

Cl/HCO_3^- et Na^+/H^+ , les transporteurs sodium bicarbonate et les mécanismes régissant la libération de l'ATP (C. Li & Naren, 2010).

A l'instar du chlore, la protéine CFTR, joue un rôle prépondérant dans le transport transmembranaire du glutathion ou *γ -glutamyl-cysteinyl-glycine* (GSH). Ce tripeptide constitue la première ligne de défense antioxydante cellulaire (GSH) (Biswas, Chida, & Rahman, 2006; Masella, Di Benedetto, Vari, Filesi, & Giovannini, 2005). On attribue, également au CFTR, le transport du nitrate (NO_3^-), du bicarbonate (HCO_3^-), du formate et de l'acétate (Naruse, 2002; Wine, 2001). Son implication dans la régulation du transport vésiculaire intracellulaire et dans l'acidification des organelles intracellulaires a aussi été rapportée (O'Sullivan & Freedman, 2009).

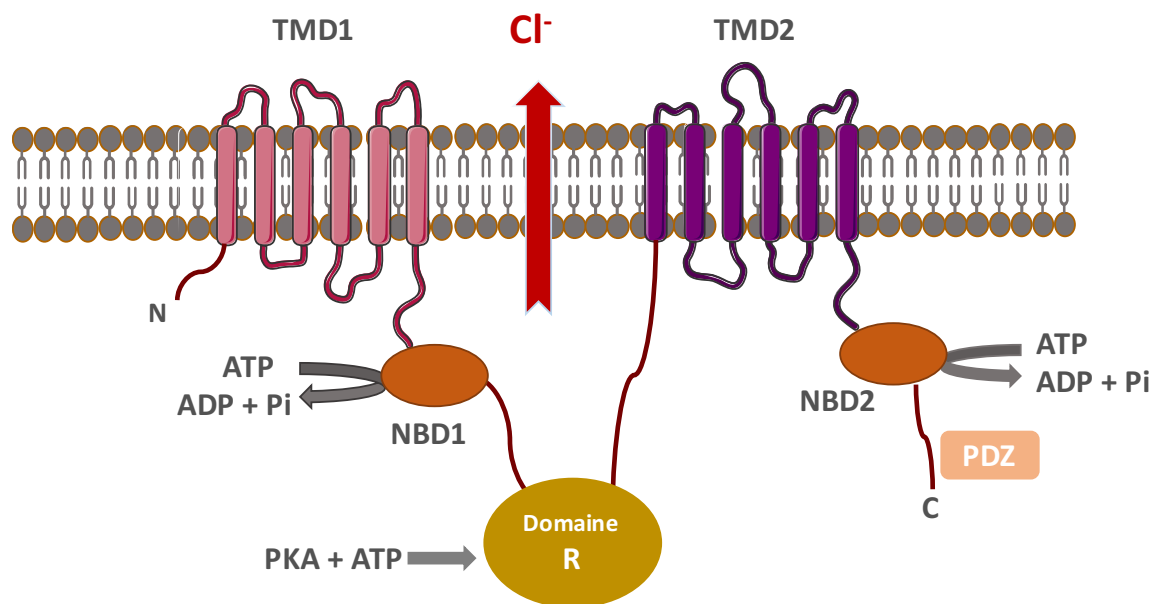


Figure 2. Représentation de la protéine CFTR

CFTR est composée de 2 domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2), 2 domaines intracellulaires de liaison nucléotidiques (NBD1 et NBD2) et un domaine R reliant les 2 moitiés de la protéine. (adapté de Verhaege 2007) (Verhaege, 2007)

1.4 Symptomatologie clinique

1.4.1 Manifestations digestives

Les manifestations digestives de la FK surviennent précocement, le plus souvent en période néonatale. Elles sont intestinales, pancréatiques et hépatobiliaires. Les désordres conjoints qu'elles engendrent du fait de leur intrication, aboutissent à une maldigestion et à une malabsorption intestinale des lipides, des protéines et des vitamines liposolubles (ADEK) (Mouterde, 2007; Anne Munck, 2005). L'effondrement des taux vitaminiques liposolubles et le déficit en AGE qui s'en suivent, sont le corolaire des patients de FK. Dans la majeure partie des cas, ces désordres digestifs seront d'évolution insidieuse, parsemée de complications à type de dénutrition avec hypoprotéïnémie et œdèmes, de retard staturopondéral et de troubles métaboliques. Ils finiront par compromettre le pronostic vital à long terme (Dorsey et al., 2010). Cependant, il est opportun de souligner que certains patients de FK, environ 13%, seront en surpoids ou présenteront une obésité. Ces patients sont en général porteurs d'une mutation autre que p.Phe508del. Contrairement au sujet génétiquement sain, ce gain pondéral sera associé à de meilleures fonctions pulmonaire et pancréatique sans faire le lit au diabète et à la maladie hépatique. La colonisation par le *Pseudomonas aeruginosa* sera également moindre dans ce groupe. Les effets bénéfiques de ce surpoids chez l'adulte concernent néanmoins les sujets ayant un indice de masse corporelle (IMC) < 23 kg/m² (Panagopoulou, Fotoulaki, Nikolaou, & Nousia-Arvanitakis, 2014).

1.4.1.1 Symptomatologie gastro-intestinale

Elle constitue dans la majeure partie des cas, le mode de révélation de la pathologie chez le nouveau-né. Le tableau clinique typique est celui d'une occlusion néonatale liée à la présence d'un iléus méconial (Mouterde, 2007; Anne Munck, 2005). On note une perturbation de la motilité marquée par un allongement du temps de vidange gastrique et du temps de transit intestinal (Dalzell, Freestone, Billington, & Heaf, 1990; Taylor et al., 1999). Une hyperplasie des glandes de Brunner et des cellules de Goblet est rapportée. Des complications à type d'atrésie, de perforations et même de péritonites peuvent survenir. Les manifestations gastro-intestinales de la FK peuvent cependant revêtir des allures différentes à type de constipation, de

syndrome d'obstruction de l'intestin distal, de reflux gastro œsophagien, de sténose colique, de prolapsus rectal et de cancer (Dorsey et al., 2010).

1.4.1.2 Symptomatologie pancréatique

Les désordres pancréatiques rapportés dans la FK touchent à la fois les fonctions exocrine et endocrine. L'insuffisance pancréatique exocrine (IPE) est surtout l'apanage des patients porteurs de mutations sévères (I, II et III) (Kristidis et al., 1992) et se traduit par une stéatorrhée réfractaire, difficile à juguler, quasi-pathognomonique de la FK. Elle survient précocement et prévaut chez 85 % des patients (Gonska, 2016; Strandvik, 2010), couplée à une déficience de l'absorption des vitamines liposolubles. Le tiers des enfants atteints de FK présentent une IPE dès la naissance tandis que les autres la développeront autour de l'âge de 2-3 ans (Ntimbane et al., 2009). Les dommages pancréatiques débuteraient durant la vie intra utérine, caractérisés par une atrophie progressive des acini (Ntimbane et al., 2009). La stéatorrhée atteste de la malabsorption intestinale qui résulte d'une chute de la sécrétion de lipase pancréatique en deçà de 10% de la normale (Waters et al., 1988; Wouthuyzen-Bakker, Bodewes, & Verkade, 2011). En effet, la fibrose du pancréas exocrine, décrite comme conséquence ultime de l'obstruction canalaire par les sécrétions épaisses et visqueuses, aboutit à un défaut de prolifération des cellules sécrétoires (Cohen, Morrow, John Cork, Delcarpio, & Larson, 1998; Shalon & Adelson, 1996). En outre, les déficiences en lipase/colipase, en cholestérol estérase de même qu'en Phospholipase A1 et A2 (PLA1, PLA2) limitent l'hydrolyse des lipides et, de ce fait, corrompent l'efficacité de leur absorption (Peretti, Marcil, Drouin, & Levy, 2005).

L'atteinte endocrine du pancréas est quant à elle marquée par la survenue d'un diabète de type particulier qui intègre les caractéristiques des types I et II. Ainsi, l'altération de la sécrétion insulinique coexiste avec la résistance à l'insuline (Zirbes & Milla, 2009). Tandis que la première découle de la perte progressive des cellules β des îlots de Langerhans, la seconde est décrite comme la résultante d'une multitude de facteurs, incluant l'infection et l'inflammation chroniques, la malnutrition, l'augmentation de la dépense énergétique, le déficit en glucagon, la dysfonction hépatique, la malabsorption et l'âge (Marshall et al., 2005). Le diabète de la FK a vu sa prévalence augmenter parallèlement à l'allongement de l'espérance de vie des patients et le genre féminin serait le plus touché. La prévalence chez les femmes serait de 17%

comparativement à 12% chez les hommes (Marshall et al., 2005). Certaines études rapportent que 70 à 90 % des patients de FK qui atteignent 40 ans risquent de développer le diabète (Zirbes & Milla, 2009). Sa survenue majore la morbidité et abrège les années de vie des patients (Liou et al., 2001). Il est admis que les patients homozygotes porteurs de la mutation p.Phe508del et qui présentent une baisse de la tolérance au glucose sont plus à risque de développer un diabète de FK même si aucune corrélation claire n'a pu être établie à ce jour (Ntimbane et al., 2009). Des épisodes de pancréatites récurrentes sont également rapportés (Dorsey et al., 2010).

1.4.1.3 Symptomatologie hépatobiliaire

L'atteinte hépatobiliaire dans la FK se traduit par une obstruction des canalicules biliaires. Le tableau clinique peut être celui d'une rétention biliaire, d'un ictère, d'une cirrhose, d'une hypertension portale, d'une insuffisance hépatocellulaire ou encore d'une stéatose hépatique (Mouterde, 2007; Anne Munck, 2005). Néanmoins, le tableau le plus caractéristique est celui d'une cirrhose biliaire focale qui associe une inflammation, une prolifération biliaire et une fibrose (Meyerholz, Stoltz, Pezzulo, & Welsh, 2010). La survenue d'une stéatose hépatique dans un contexte de déficit en AGE, notamment en acide linoléique (LA), est également bien connue (Allmann, Hubbard, & Gibson, 1965). Les mécanismes potentiels suggérés pour expliquer cette accumulation de lipides dans le foie sont une augmentation de la capture des lipides circulants, une intensification de la lipogenèse *de novo*, une diminution de la β -oxydation des AG ou encore une baisse de la sécrétion de lipoprotéines par le foie (Werner et al., 2005). On attribue aux acides gras polyinsaturés (AGPI) des propriétés de suppresseurs de la synthèse des AG à travers l'inhibition de la *sterol response element binding protein* de classe C (SREBP1c) et d'inducteurs de leur β -oxydation par l'activation du *peroxisome proliferator-activated receptor α* (PPAR α) (Werner et al., 2005). En tout état de cause, les anomalies de la sécrétion des sels biliaires ont un retentissement patent sur la digestion et l'absorption intestinale des lipides.

1.4.2 Manifestations respiratoires

1.4.2.1 Symptomatologie broncho-pulmonaire

Elle est en avant du tableau clinique, bruyante et suscite beaucoup d'intérêts parce qu'elle constitue un facteur majeur de morbi-mortalité (Chanson, 2009). Elle engage le pronostic vital

immédiat d'où la nécessité d'une prise en charge rapide et efficace afin de préserver la survie des patients. La symptomatologie respiratoire de la FK est dominée par l'installation progressive d'une insuffisance respiratoire obstructive dans un contexte d'infection et d'inflammation chroniques. Ce tableau évolue rapidement vers une détresse respiratoire et une destruction du parenchyme pulmonaire. L'altération des mouvements muco-ciliaires du fait de l'épaississement et de la viscosité du mucus fait le lit à la pullulation microbienne. Les germes couramment rencontrés sont l'*Haemophilus influenzae*, le *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* et le *Pseudomonas aeruginosa* dont la protéine CFTR possède le récepteur au lipopolysaccharides (LPS). La présence des deux premiers germes est le plus souvent rapportée au cours de la première année de vie, et précède dans la majeure partie des cas, l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* (Rosenstein & Cutting, 1998). La défectuosité de la protéine CFTR en compromettant le fonctionnement du récepteur au LPS, perturbe l'internalisation et la destruction du *Pseudomonas aeruginosa* contribuant ainsi à la persistance de l'infection. Cette dernière s'accompagne également d'une métaplasie des cellules de Goblet et d'une infiltration neutrophilique (Mall, Grubb, Harkema, O'Neal, & Boucher, 2004). L'inflammation a longtemps été perçue comme une « conséquence évidente » de l'infection jusqu'à ce que sa présence bien antérieure à la colonisation bactérienne ait été démontrée. La mise en évidence d'une infiltration macrophagique des poumons de fœtus mucoviscidosiques, d'une production accrue de TNF α par les macrophages des patients de FK, d'une neutrophilie massive et des teneurs élevées en IL-8 dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire de jeunes enfants atteints de FK et exempts de toute infection, ont totalement révolutionné la donne en ce qui concerne l'inflammation (Verhaege, 2007). Elle apparait de plus en plus comme un acteur central de la physiopathologie de la FK

1.4.2.2 Symptomatologie extra pulmonaire

Les patients de FK peuvent présenter des polypes nasaux et des épisodes de sinusites chroniques. L'apparition d'un hippocratisme digital témoigne de la sévérité de l'atteinte pulmonaire (Rosenstein & Cutting, 1998).

1.4.3 Autres symptômes

La sueur salée, due à l'augmentation de la concentration en chlorure de sodium (> 60 mmol/L), est classique de la FK (L. E. Gibson & Cooke, 1959). L'étude de la corrélation entre la teneur en chlore de la sueur et le génotype a révélé des similitudes chez les patients atteints des mutations de classe I, II et III. Les patients atteints de la mutation de classe IV (baisse de la conductance) présentent des niveaux significativement bas de chlore dans la sueur tandis que ceux atteints de la mutation de classe V présentent des concentrations proches des classes I-III (M. Wilschanski et al., 1995). Les patients de FK peuvent être aussi sujets à des cardiopathies à type d'hypertrophie de la carotide (Lack, Perez-Atayde, & Young, 1985), à l'ostéoporose (Donovan et al., 1998) et à une hypothyroïdie infraclinique (H. Li, Ganta, & Fong, 2010). L'infertilité est causée chez l'homme par une fibrose, une atrophie ou une absence des canaux déférents. Elle est irréversible du fait de l'azoospermie. Chez la femme, il s'agira d'un épaissement et d'une déshydratation du mucus cervical ou encore d'une obstruction tubaire et cette infertilité peut être réversible (Rosenstein & Cutting, 1998).

1.5 Déséquilibre en acides gras essentiels et déficience en vitamines liposolubles

1.5.1 Déséquilibre en acides gras essentiels

Le déséquilibre en AGE est un désordre classique et constant dans la FK. Il a été décrit longtemps avant la découverte de la nature monogénique de la maladie. Une corrélation a d'ailleurs été établie entre la sévérité de la FK et l'importance des désordres lipidiques qui contribuent au terrain inflammatoire typique des patients (Van Biervliet, Van Biervliet, Robberecht, & Christophe, 2010). Il se traduit dans la majeure partie des cas par une augmentation de l'acide arachidonique (AA, 20:4n-6) associée à une baisse des acides linoléique (LA, 18:2n-6) et docosahexaénoïque (DHA, 22:6n-3) (Chanson, 2009; Strandvik, 2010). Ces désordres ont longtemps été attribués à la malabsorption intestinale secondaire à l'IPE (Strandvik, 2010). Cependant, l'absence de correction de ce déséquilibre suite à l'administration d'extraits pancréatiques a conduit à la proposition d'autres mécanismes étiologiques (Miz-

Echevarri'A et al., 2009). Il s'agit notamment de la consommation alimentaire inadéquate d'AGE, d'une intensification de la β -oxydation des AGPI, d'une augmentation de la production des éicosanoïdes pro-inflammatoires, d'une majoration de la peroxydation des AGPI, d'une anomalie des désaturases ou de l'activité de la lipase hépatique ou encore de la possibilité d'un défaut intrinsèque du métabolisme des AGE dans les cellules épithéliales intestinales de FK (Mimoun et al., 2009; Njoroge, Laposata, Katrangi, & Seegmiller, 2012; L. G. Wood, D. A. Fitzgerald, A. K. Lee, & M. L. Garg, 2003). Plusieurs études ayant procédé à une supplémentation en DHA ou en acide éicosapentaénoïque (EPA) associée à des vitamines antioxydantes ont rapporté un rétablissement du déséquilibre en AGE sur des modèles *in vitro* (Njoroge et al., 2012) *in vivo* (Mimoun et al., 2009) et chez l'humain (L. G. Wood et al., 2003). Cependant, l'absence d'une amélioration des fonctions respiratoires suite aux tentatives de correction du déséquilibre lipidique est rapportée (Chanson, 2009). Plusieurs interrogations restent encore sans réponse en ce qui concerne les anomalies lipidiques dans la FK. Les mécanismes qui sous-tendent sa genèse et sa persistance restent à élucider, d'où les propositions de recherche de la présente thèse de doctorat.

1.5.2 Déficience en vitamines liposolubles

La déficience en vitamines liposolubles est bien connue dans le contexte de la FK et diagnostiquée avant l'âge de 3 mois. Elle est décrite comme étant une conséquence de la malabsorption intestinale et se caractérise par une baisse des taux sériques de rétinol, de 25-hydroxy vitamine D, d' α -tocophérol et du ratio α -tocophérol/ lipides totaux (Sokol et al., 1989). La déficience en vitamine K se traduit par la formation de protéines décarboxylées et non fonctionnelles, incapables de se lier au calcium et aux phospholipides (*Protein Induced by Vitamin K Absence* ou PIVKA). L'élévation des taux plasmatiques de ces protéines considérées comme des facteurs de coagulation anormaux, est concomitante à celle de la prothrombine décarboxylée (*Prothrombin In Vitamin K absence* ou PIVKA- II) (Wilson et al., 2001). Le déficit en vitamine K semble plus constant chez les patients de FK avec insuffisance pancréatique et ce d'autant plus qu'ils présentent une hépatopathie en lien avec leur maladie génétique (Wilson et al., 2001). La supplémentation en extraits pancréatiques associée aux complexes vitaminiques conduit à des résultats divergents en ce qui concerne la correction des

déficits (Durieu et al., 2007; Iuliano et al., 2009). En tout état de cause, la persistance ou la récurrence d'un déficit résiduel malgré les suppléments vitaminiques est fréquemment mentionnée (Donovan et al., 1998; Feranchak et al., 1999; S. H. Huang, Schall, Zemel, & Stallings, 2006; Sokol et al., 1989).

1.6 Physiopathologie

La physiopathologie de la FK est reconnue pour sa complexité et plusieurs théories ou mécanismes ont été proposés afin d'améliorer sa compréhension.

1.6.1 Théorie des troubles hydro-électrolytiques

La protéine CFTR, en sa qualité de canal chlore est nettement impliquée dans le maintien de l'équilibre hydro-électrolytique des sécrétions épithéliales exocrines. Son rôle pivot dans la modulation des fonctions des autres canaux ioniques situés à la membrane apicale souligne le caractère primordial de sa fonctionnalité optimale. La théorie des troubles hydro-électrolytiques a été évoquée dès le départ à cause de l'altération fonctionnelle de plusieurs organes en lien avec l'obstruction de leurs canaux glandulaires. Cet état de fait est alarmant au niveau des voies respiratoires à cause du risque vital immédiat, mais est aussi valable pour tous les organes qui expriment la protéine CFTR y compris l'intestin. En effet, le mucus épais et visqueux à la surface des cellules épithéliales bronchiques constitue un milieu favorable à la prolifération bactérienne et pour la plupart, le point de départ de l'inflammation chronique et généralisée rapportée dans la FK. Le lien étroit entre le changement des caractéristiques du mucus et l'infection chronique a suscité deux hypothèses. La première stipule qu'une forte teneur en sel du liquide de surface alvéolaire des cellules de FK, secondaire au blocage du mouvement transmembranaire du chlore, serait le facteur favorisant de la multiplication bactérienne. En effet, la concentration élevée en sodium inhiberait les défenses antibactériennes endogènes (Zabner, Smith, Karp, Widdicombe, & Welsh, 1998). Cette hypothèse ne corrobore pas avec la mise en évidence au niveau apical, d'un mécanisme d'hyperabsorption du Na s'accompagnant d'un mouvement d'eau de la lumière vers le milieu intracellulaire. Ceci en lien avec la perte de l'inhibition physiologique du canal ENAC par la protéine CFTR (Boucher, Stutts, Knowles, Cantley, & Gatzky, 1986). La seconde hypothèse, suggérant plutôt la déplétion du volume du mucus, sa déshydratation, et la limitation consécutive des mouvements mucociliaires

aboutissant à une faible clairance des bactéries, à l'infection et à l'inflammation neutrophilique, est la plus admise (Matsui et al., 1998; Tarran et al., 2001).

L'intestin exhibe une forte expression de protéines CFTR au niveau du duodénum. Ce dernier, tout comme le pancréas, joue un rôle majeur dans la régulation du pH dans le grêle. La défectuosité du CFTR va conduire à une acidification du contenu luminal compromettant ainsi l'activité des enzymes pancréatiques et des sels biliaries. En outre, le mucus épais et visqueux, consécutif aux désordres hydro-électrolytiques, va constituer une couche imperméable au dessus du revêtement épithélial, obstruant ainsi les cryptes et altérant le contact entre les nutriments et les entérocytes (Gonska, 2016). Des études *in vivo* rapportent une altération de la maturation entérocytaire et une réduction significative de l'expression de plusieurs transporteurs de nutriments dans la FK. Une décroissance de l'expression de 21 gènes impliqués dans les fonctions de digestion et d'assimilation entérocytaires a également été diagnostiquée par technologie de biopuces (*microarray*). Parmi ces gènes sont inclus *disaccharidase lactase*, *Fatty Acid Binding Protein 2* (FABP2) et *IMINO acid transporter* (Slc6a20b). Le recours à une solution laxative osmotique pour restaurer l'hydratation du contenu intestinal induit une augmentation significative de l'expression des gènes identifiés (R. C. De Lisle, 2016).

1.6.2 Théorie du déséquilibre en acides gras essentiels

Le déséquilibre en AGE observé dans la FK a été corrélé à la sévérité du génotype et serait un acteur fondamental du profil inflammatoire des patients. En effet, l'augmentation de l'AA au détriment de LA et du DHA est favorable à l'installation de l'inflammation. L'AA est un AGPI, constituant essentiel des phospholipides (PL) membranaires. Il s'y trouve sous sa forme estérifiée qu'est le résidu arachidonyle. Sous l'action de la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2), l'AA est relargué dans le cytosol. Ce processus de relargage peut être induit par différents stimuli dont l'élévation du calcium intracellulaire. L'AA sert de précurseur aux éicosanoïdes inflammatoires *via* la voie de la cyclooxygénase (COX) ou de la lipooxygénase (LOX). Ces voies aboutissent respectivement à la synthèse des prostaglandines et des thromboxanes d'une part et des leucotriènes d'autre part (Pecker, Amadou, Magne, & Pavoine, 1998). L'AA est aussi incriminé dans l'augmentation de la synthèse des espèces réactives d'oxygène (ROS), dans la peroxydation lipidique, dans l'effondrement du potentiel de membrane et de la production d'ATP au niveau de la mitochondrie (Caro & Cederbaum, 2007;

Rottner, Freyssinet, & Martinez, 2009; Taha et al., 2010). Inversement, le DHA, décrit comme un inhibiteur du métabolisme de l'AA, limite la production des éicosanoïdes pro-inflammatoires (Calder, 2002). Par ailleurs, il existe un lien étroit entre le SOx et les AG. En effet, ces derniers sont capables de moduler la production des ROS dans la mitochondrie, les neutrophiles phagocytaires et le RE. Leur capacité à majorer le SOx par le biais d'une réduction des activités enzymatiques antioxydantes est aussi rapportée (Schonfeld & Wojtczak, 2008). Ces différents constats mettent en exergue la part des désordres lipidiques dans la genèse du SOx et de l'inflammation dans la FK, tout en suggérant un bénéfice potentiel de leur correction. Les résultats des études de supplémentation en AGE sont mitigés. Tandis que certaines rapportent une amélioration, d'autres mentionnent la persistance du SOx et des anomalies des AG (Miz-Echevarria et al., 2009; L. G. Wood et al., 2001). En outre, l'élévation parallèle des concentrations plasmatiques en AG et en ROS met en doute le bien fondé du régime hyperlipidique prescrit chez les patients (L. G. Wood et al., 2003).

1.6.3 Théorie du SOx et de l'inflammation

Le SOx et l'inflammation sont deux processus intimement liés connus pour s'aggraver mutuellement. Le SOx est capable d'induire l'inflammation en activant les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 ou en induisant la libération membranaire de l'AA sous l'action de la PLA2. En retour, les neutrophiles, médiateurs de l'inflammation sont capables de produire de grandes quantités de ROS (Cantin et al., 2007; Hansen, Go, & Jones, 2006). Leur implication dans la physiopathologie de la FK est de description plus récente et largement admise. En effet, l'identification de leurs marqueurs dans différents organes témoigne de leur participation à la genèse des anomalies. La précocité de cette présence (stade fœtal) notamment en ce qui concerne les marqueurs inflammatoires (Verhaege, 2007), en dehors de tout contexte infectieux, suggère la possibilité d'un rôle d'instigateurs à l'émergence des désordres. Ces deux processus physiopathologiques ont fait l'objet de plusieurs études au niveau des poumons et ce au détriment des autres organes dont l'intestin. La FK regroupe plusieurs caractéristiques en faveur d'un profil pro-oxydant et pro-inflammatoire : le déficit en GSH, en vitamines et enzymes antioxydantes liposolubles notamment la vitamine E (α - et γ -tocophérol) et le coenzyme Q (CoQ10), l'infection chronique associée à la neutrophilie massive et persistante, le déséquilibre en AGE, etc. Cependant, les rôles du SOx et de l'inflammation dans la FK ne sont pas encore

totallement définis. Plusieurs aspects restent à élucider, notamment dans l'intestin qui présente de fortes prédispositions oxydatives et inflammatoires pouvant contribuer aux anomalies lipidiques rapportées.

Ces différentes théories considérées isolément sont incapables d'expliquer l'ensemble des anomalies identifiées. Elles apparaissent fort probablement intriquées et complémentaires dans la genèse du tableau clinique complexe de la FK. L'exemple type est celui du déficit en AGE qui semble résulter à la fois des troubles hydro-électrolytiques, du SOx et de l'inflammation. En outre la compréhension des mécanismes dont il relève impose l'exploration d'autres organes tels que la mitochondrie dont le rôle clé dans l'homéostasie redox et la β -oxydation des AG est bien connu. Cette thèse vise à élucider la part du SOx, de l'inflammation ainsi que de la mitochondrie dans les anomalies lipidiques.

1.7 Diagnostic de la FK

La gravité de la FK impose un diagnostic qui soit précoce et le plus précis possible. Ceci permet une prise en charge rapide et efficace, une évaluation du pronostic, une estimation de la nécessité de recourir à des services médicaux spécialisés et un conseil génétique (Rosenstein & Cutting, 1998). Avant la découverte du gène *CFTR* en 1989, le diagnostic de FK était fortement suspecté devant la présence de signes cliniques évocateurs tels que les troubles respiratoires, l'iléus méconial, le retard de croissance et la stéatorrhée (R. L. Gibson, Burns, & Ramsey, 2003). La confirmation du diagnostic reposait sur la mise en évidence d'une concentration en chlore > 60 mmol/L dans la sueur (Rosenstein & Cutting, 1998).

Depuis, la liste des critères orientant vers le diagnostic de FK s'est vue étoffée par l'ajout de signes cliniques, radiologiques et histologiques spécifiques, témoignant des atteintes primaires ou des complications évolutives de la maladie (P. M. Farrell et al., 2001) (tableau I).

Actuellement, le diagnostic de la FK fait l'objet d'un consensus et repose sur la présence d'une ou de plusieurs caractéristiques phénotypiques, d'antécédents de FK dans la fratrie ou d'un résultat positif au test de dépistage néonatal et d'une évidence d'anomalie fonctionnelle de la protéine CFTR. Cette anomalie étant démontrée par une élévation de la concentration de chlore

dans la sueur ou l'identification d'une des mutations causant la maladie sur chaque copie du gène *CFTR* ou une démonstration d'anomalies dans le transport ionique transépithélial nasal (Philip M Farrell et al., 2008).

Tableau I. Caractéristiques phénotypiques de la Fibrose kystique

Syndromes	Manifestations
Maladies sinusiennes et pulmonaire chronique	<ul style="list-style-type: none"> a. Colonisation/infection par <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Haemophilus influenzae</i> non typable, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoïde et non mucoïde, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> et <i>Burkholderia cepacia</i> b. Toux chronique avec expectorations c. Bronchectasie, atélectasie, infiltrats et hyperinflation persistantes (Rx pulmonaire) d. Obstruction des voies respiratoires (wheezing, piégeage d'air) e. Polypes nasaux, anomalies des sinus paranasaux (tomodensitométrie et Rx) f. Hippocratisme digital
Anomalies gastro-intestinales et nutritionnelles	<ul style="list-style-type: none"> a. Iléus méconial, syndrome d'obstruction de l'intestin distal, prolapsus rectal b. Insuffisance pancréatique, pancréatite chronique et aigue récurrente, anomalies (Rx) c. Ictère néonatal prolongé, maladie hépatique chronique, cirrhose biliaire focale ou multi-lobulaire (clinique/histologie) d. Malnutrition protéino énergétique, hypoprotéïnémie avec œdèmes, complications secondaires des déficiences en vitamines liposolubles
Syndrome de perte de sel	<ul style="list-style-type: none"> a. Déplétion sodée aigue b. Alcalose métabolique chronique
Anomalies génitales chez les sujets masculins	<ul style="list-style-type: none"> a. Stérilité secondaire à une azoospermie obstructive

Adapté de (Philip M Farrell et al., 2008; Rosenstein & Cutting, 1998).

Le test à la sueur demeure un test de référence diagnostique dans la FK. Il consiste à quantifier la teneur en chlore mais aussi de sodium dans la sueur obtenue par iontophorèse à la pilocarpine. Selon le procédé de Cooke et Gibson, un poids minimal de 75 mg de sueur est requis et devra être recueilli durant une période de 30 mn pour s'assurer d'un rendement moyen de sueur de plus de 1g/m²/mn. La technique consiste en une administration transdermique de pilocarpine par iontophorèse pour stimuler la sécrétion de la glande sudoripare. Ceci nécessite l'application d'un courant de faible intensité. La sueur est ensuite recueillie à l'aide d'une compresse ou d'un

papier filtre, puis quantifiée avant de procéder à la mesure de la concentration en chlore (L. E. Gibson & Cooke, 1959). Dans les conditions physiologiques, cette concentration chlorée est de l'ordre de 40mmol/L. Lorsque le test à la sueur s'avère normal ou intermédiaire en dépit d'une forte suspicion, le recours à l'analyse génétique et à la mesure de la différence de potentiel transépithélial nasal est requis. Cette dernière méthode permet une évaluation directe et sensible du transport de chlore et de sodium dans les cellules épithéliales nasales et ce par l'évaluation de leur propriétés bioélectriques (De Boeck et al., 2011). Dans la FK, on note une anomalie dans le transport ionique transépithélial nasal et la différence de potentiel est davantage négative du fait de la perte de l'inhibition physiologique du canal Enac par la protéine CFTR. Les valeurs basales de la différence de potentiel nasal chez les patients de FK sont de -50mV comparativement à -20mV chez les sujets sains (De Boeck et al., 2011).

Les tests génétiques se sont vus intégrer dans un but de confirmation diagnostique et d'identification du type de mutation en cause. Ils sont recommandés avant toute conception en cas d'antécédents familiaux de FK, proposés en l'absence d'antécédents évocateurs et indispensables en cas de test de dépistage néonatal positif. Celui-ci se traduit par l'élévation de la trypsine immunoréactive dans une goutte de sang séché prélevé au 5^{ème} jour de vie (Ciske, Haavisto, Laxova, Rock, & Farrell, 2001; P. M. Farrell et al., 2001). Il existe plusieurs tests génétiques commerciaux permettant le dépistage d'environ 90% des mutations. Cependant, réserve est émise quant au diagnostic des mutations rares.

La mesure du courant intestinal a toute son importance en cas d'ambiguïté diagnostique. Elle consiste à mesurer à l'aide de chambres « Mini-Ussing », le courant de court-circuit transépithélial dans des biopsies d'aspiration rectale fraîchement prélevées chez l'humain. Ceci reflétant la mesure du transport ionique après stimulation par des agents de sécrétion du chlore (Derichs et al., 2010). Ce test est basé sur le principe de la conjugaison des mouvements ioniques, au niveau des membranes apicale et basolatérale des cellules épithéliales intestinales ainsi que des phénomènes d'adaptation enregistrés dans le contexte de la FK. En effet, dans les conditions physiologiques, dans l'intestin, les agonistes du calcium et de l'AMPc agissent de façon synergique pour déterminer l'ampleur de la sécrétion du chlore par la protéine CFTR. L'ouverture du canal CFTR en apical va donc s'accompagner d'une activation du canal potassique en basolatéral consécutive à une élévation du calcium intracellulaire. Ceci crée un gradient électrique favorable à la sortie du chlore. Dans le contexte de la FK, il a été identifié *in*

vivo, au niveau de la membrane apicale des tissus épithéliaux, une régulation positive et compensatoire de la conductance de chlore activée par le calcium et qui est sensible au 4-diisothiocyanatostilbene-2,2-disulfonic acid (DIDS). Ce phénomène est indétectable chez les souris "type sauvage" ou « wild type » (De Boeck et al., 2011). Ceci a été également mis en évidence chez des patients homozygotes p.Phe508del (Bronsveld et al., 2001). La mesure du courant intestinal intervient aussi dans la surveillance de l'influence des gènes modificateurs sur l'épithélium intestinal natif (Bronsveld et al., 2001) et dans l'évaluation de l'efficacité des nouvelles molécules thérapeutiques de la FK (Amaral & Kunzelmann, 2007). Chez les patients porteurs d'un phénotype atypique certains tests peuvent s'avérer nécessaires tels que l'évaluation de la fonction du pancréas exocrine, la microbiologie du tractus respiratoire et l'évaluation urogénitale (Rosenstein & Cutting, 1998).

1.8 Traitement de la FK

1.8.1 Traitement symptomatique

La prise en charge des patients de FK a été au départ, purement symptomatique en vue d'améliorer la qualité de vie et de prolonger la survie des patients. Elle a eu l'avantage de conduire la plupart d'entre eux à l'âge adulte. Cette prise en charge est encore de vigueur jusqu'à la mise au point définitive d'un traitement curatif efficace.

Elle s'articule autour de 2 objectifs majeurs que sont :

- Le maintien d'un état nutritionnel le plus adéquat possible

Le lien étroit qui existe entre le statut nutritionnel, la fonction pulmonaire, la colonisation par le *Pseudomonas aeruginosa*, la fonction pancréatique exocrine et le génotype donne toute la priorité à la préservation du statut nutritionnel des patients (Panagopoulou et al., 2014). En effet, le statut nutritionnel dans la FK a une forte valeur prédictive de la survie des patients. Le maintien du statut nutritionnel passe par l'administration de repas hyperlipidiques et hypercaloriques ainsi que d'extraits pancréatiques gastro-résistants qui correspondent à une préparation d'enzymes entériques porcines enrobées (*Pancreatic exocrine replacement therapy* ou PERT) (Gonska, 2016). Ceci vise une optimisation de l'absorption des lipides et vitamines liposolubles, en vue de minimiser la stéatorrhée et le déficit vitaminique. Cependant, force est

de constater qu'en dépit de l'intense support nutritionnel entéral et parfois parentéral, la majeure partie des patients (70%) sont en deçà des valeurs objectives de l'IMC (Panagopoulou et al., 2014).

- La stabilisation de la fonction respiratoire

Elle fait intervenir la kinésithérapie respiratoire, la nébulisation de drogues mucolytiques et une antibiothérapie intensive au long cours. L'objectif est de minimiser l'accumulation du mucus épais et visqueux et de prévenir l'infection. Ce volet est indispensable pour la préservation du pronostic vital immédiat (Proesmans, Vermeulen, & De Boeck, 2008).

1.8.2 Thérapie génique

La thérapie génique, dans le contexte de la FK, suscite beaucoup d'intérêts du fait qu'elle soit porteuse d'espoir quant à la découverte d'un traitement curatif. Le clonage du *CFTR* a nettement amélioré la compréhension de la pathologie et donné libre cours à une intensification de la recherche visant la mise au point d'un traitement génétique. Après s'être heurtée à de nombreuses difficultés en lien avec la complexité de la maladie, la thérapie génique a récemment connu des avancées considérables.

Le choix du vecteur s'est au préalable porté sur les virus tels que les lentivirus et notamment de la famille des *Retroviridae*. Ces derniers avaient démontré leur capacité à s'intégrer au génome et à induire une expression génique de longue durée *in vivo* (Castellani & Conese, 2010). Par la suite, l'intérêt s'est porté sur les adénovirus et les vecteurs adénoviraux recombinants. Les essais cliniques menés avec les vecteurs viraux avaient fait preuve d'innocuité et de tolérance sans toutefois aboutir à des résultats cliniques clairs et stables (Vidović et al., 2016). En effet, la couche de mucus au versant apical constitue une barrière considérable limitant la fixation du virus à sa cible. En outre, les récepteurs des vecteurs viraux sont majoritairement localisés au pôle basolatéral de la membrane cellulaire et sont difficiles d'accès du fait des jonctions serrées (Castellani & Conese, 2010). Une limite à l'usage des vecteurs viraux est l'émergence d'anticorps neutralisants suite à leurs administrations itératives. Des recherches récentes ont abouti à l'élaboration d'un vecteur adénoviral recombinant comprenant un ADN complémentaire de *CFTR* tronqué et une version courte du promoteur du cytomégalo virus (CMV173) pour optimiser l'expression génique. Son administration permet d'améliorer la

fonction canalaire et donc les échanges hydro-électrolytiques dans les organoïdes intestinaux et dans la muqueuse nasale de souris FK (Vidović et al., 2016).

Le recours à une approche non virale dans la thérapie génique du *CFTR* est de plus en plus prônée et des études sont en cours, pour la finalisation de cette approche. Elles concernent notamment le vecteur, le dosage génique, la voie d'administration et l'innocuité du traitement. (Bell, 2015). L'introduction dans les poumons, par le biais de nébulisations répétées, d'un complexe formé d'ADN plasmidique codant pour le *CFTR* et d'un liposome cationique (pGM-169/GL67A) a conduit à une stabilisation de la fonction pulmonaire. Ce procédé prometteur permet certes le transfert d'une importante charge génétique, mais il reste limité par le caractère taux-dépendant de l'étape de transfert du cytoplasme au noyau. Il est encore en phase d'expérimentation (Alton et al., 2015).

1.8.3 Réparateurs de l'ARNm

Une autre stratégie thérapeutique utilise des oligonucléotides anti-sens pour corriger les aberrations d'épissage du pré ARNm rencontré dans la mutation c.2657+5G>A du *CFTR*. Ces anomalies d'épissage représentent environ 13% de l'ensemble des mutations. Cette stratégie permet une restauration quasi totale (95%) de l'exon manquant et une majoration du nombre de protéines CFTR fonctionnelles au pôle apical (Igreja, Clarke, Botelho, Marques, & Amaral, 2016).

1.8.4 Trans-lecteurs

L'Ataluren® (PTC124) est un médicament récent en phase d'expérimentation, développé en vue de restaurer la production de protéines CFTR fonctionnelles, chez les patients porteurs de mutations non-sens. Il induit une trans-lecture ribosomale des codons stop prématurés de l'ARNm (Michael Wilschanski et al., 2011).

1.8.5 Traitement médicamenteux

La recherche a récemment abouti au développement de petites molécules, d'administration orale que sont l'Ivacaftor (Kalydeco®) et le Lumacaftor. L'Ivacaftor est doté de la capacité de potentialiser le CFTR. Il accroît *in vitro* la probabilité d'ouverture du canal CFTR permettant

ainsi une amélioration significative de l'activité canalaire. En outre, il potentialise la localisation membranaire de la protéine p.Phe508del. Son usage est autorisé aux États Unis, au Canada et dans les pays de l'Union Européenne, pour le traitement des patients de FK, porteurs de la mutation *Gly551Asp-CFTR* (G551D) et d'âge ≥ 6 ans. L'Ivacaftor induit une amélioration de la fonction pulmonaire dès la deuxième semaine de traitement et, au bout de 48 semaines, on note un gain pondéral et un effondrement de la teneur en chlore de la sueur de 50mM/L chez les patients de classe III (Bosch & De Boeck, 2016; Davies et al., 2013). Le Lumacaftor fait plutôt office de correcteur et est encore en phase d'essais cliniques. *In vitro*, Il corrige partiellement le transport de la protéine p.Phe508del vers la membrane apicale et majore ainsi le nombre de protéines qui y sont présentes (Vidović et al., 2016; Wainwright et al., 2015). La combinaison de ces deux molécules connue sous le nom commercial d'Orkambi® s'est révélée sécuritaire et efficace chez les patients porteurs de mutations de classe III (Bosch & De Boeck, 2016). Elle a en effet été associée à une élévation significative du transport transmembranaire du chlore. Cette combinaison a fait l'objet d'études chez des patients homozygotes p.Phe508del. Les conclusions rapportent une amélioration modeste (2.6-4%) mais significative de la fonction pulmonaire, caractérisée par une augmentation du volume expiratoire forcé à 1 sec (FEV₁). De même, une réduction des recrudescences pulmonaires de 30 à 39% au-delà de 24 semaines est rapportée. La fréquence des hospitalisations et l'usage intraveineux d'antibiotiques sont diminués (Wainwright et al., 2015). La majorité des jeunes patients de FK présentant un FEV₁ normal, d'autres critères d'évaluation de la fonction pulmonaire tels que l'index de clairance pulmonaire et la mesure de l'homogénéité pulmonaire sont suggérés. La mesure de la teneur en chlore de la sueur, du fait de sa disponibilité et de sa standardisation, demeure un examen de choix (Bosch & De Boeck, 2016).

Tableau II. Indications thérapeutiques dans la Fibrose kystique

Traitement	Cibles	Moyens	Indications
Thérapie génique	ADN	gène/vecteurs viraux et non viraux	Classe I
Réparateurs ARNm	ARNm	Oligonucléotides + ARN simple brin anti-sens	Classe I
Trans-lecteurs	ARNm (traduction)	Ataluren (trans-lecture ribosomale)	Classe I
Correcteurs	CFTR (repliement et trafic)	Lumacaftor	Classes III, II (p.Phe 508 del. Homozygotes)
Potentialisateurs	CFTR (ouverture canalaire)	Ivacaftor	Classes III (G551D) IV et V
Inhibiteurs de la protéostase	CFTR (stabilité membranaire)	cysteamine et epigallocatechin gallate	Classe VI
Combinaisons thérapeutiques	CFTR	Lumacaftor+ Ivacaftor	Classes III et II (p.Phe 508 del. Homozygotes)

2 Stress Oxydant

L'homéostasie redox résulte de l'équilibre entre la production des pro-oxydants et leur neutralisation efficace par les systèmes de défense antioxydante (Valko et al., 2007). Le SOx est donc communément défini comme la perte de cet équilibre au profit des pro-oxydants (Haleng, Pincemail, Defraigne, Charlier, & Chapelle, 2007). Cependant, la reconnaissance récente des ROS comme seconds messagers dans la traduction signalétique ainsi que des données d'études récentes chez l'humain pourraient plutôt le redéfinir comme une perturbation du contrôle et du signal redox (Circu & Aw, 2012; Hansen et al., 2006). Cette perturbation qui peut être causée par des ions métalliques ou des acteurs du cycle d'oxydoréduction peut s'accompagner d'une modification de l'équilibre redox. La capacité de protection des antioxydants vis-à-vis de cette perturbation n'a pu être démontrée au terme de diverses études d'intervention à grande échelle menées chez l'humain (Hansen et al., 2006).

2.1 Acteurs du stress oxydant

2.1.1 Pro-oxydants

2.1.1.1 Caractéristiques

Les pro-oxydants regroupent les espèces réactives d'oxygène (ROS), les espèces réactives d'azote et les espèces réactives de chlore. Les ROS occupent une place prépondérante dans ce groupe (Valko et al., 2007) et sont des composés intermédiaires générés par l'oxygène au cours des réactions d'oxydation. Dans la majeure partie des cas (>95%), l'oxygène (O₂) qui provient de la respiration subit une réduction tétravalente dite complète qui aboutit à la formation de 2 molécules d'eau (H₂O). Cette réaction faisant intervenir 4 e⁻, est catalysée par le cytochrome oxydase (cytochrome c, oxygène oxydoréductase) du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale (Cadenas & Davies, 2000). Néanmoins, dans une faible proportion des cas (2-5%), cette réduction s'avère incomplète et induit la génération d'espèces radicalaires. Les ROS se subdivisent en deux sous-groupes : les radicaux libres tels que l'anion superoxyde (O₂^{•-}) et le radical hydroxyle (OH[•]) et les espèces non radicalaires tels que l'oxygène singulet (¹O₂) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ces dernières font office de précurseurs de radicaux libres à partir d'une grande variété de macromolécules et de substances réactives cellulaires (Garrel, Ceballos-Picot, Germain, & Al-Gubory, 2007).

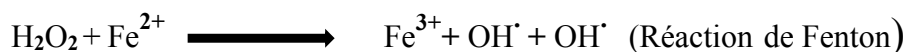
Anion superoxyde (O₂^{•-}) : Il est formé directement à partir de la molécule d'oxygène (O₂) par le biais d'un gain d'électron et est, de ce fait, considéré comme le « radical primaire ». Sa demi-vie est courte. Il est essentiellement généré par la chaîne respiratoire mitochondriale mais possède une aisance de diffusion transmembranaire. Il constitue, dans les conditions physiologiques, la source intracellulaire par excellence de radicaux oxygénés. Au cours des processus enzymatiques ou de catalyse par divers métaux (Fer) l'O₂^{•-} va générer d'autres espèces radicalaires plus réactives qualifiées de « radicaux secondaires » (Beguel, Huvet, Quillien, Lambert, & Fabioux, 2013).



Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) : C'est le produit non radicalaire de la dismutation spontanée de O₂^{•-} en présence de protons (H⁺). Elle est catalysée par la Mn-SOD mitochondriale (St-Louis, 2011)



Radical hydroxyle (OH[•]) : En l'absence de dégradation et en présence de métaux de transition sous forme réduite, H₂O₂ va générer OH[•] *via* les réactions de Fenton et/ou Haber-Weiss (Beguel et al., 2013). La réaction d'Haber-Weiss joue un rôle majeur dans la survenue de changements oxydatifs délétères ainsi que dans l'activation de la cascade des kinases (Favier, 2003). OH[•] est un radical très réactif doté d'un fort pouvoir oxydant ciblant les protéines, les acides nucléiques, les AGPI et les glucides.



Monoxyde d'azote radicalaire (NO[•]) : Sa synthèse se fait au niveau des cellules endothéliales sous l'action des NO synthases et de la L-arginine. Ce radical est impliqué dans la régulation de plusieurs fonctions physiologiques et est capable de former avec O₂^{•-}, le peroxy-nitrite (HOONO), un puissant agent oxydant ayant une diffusion membranaire large (Haleng et al., 2007) .

Radicaux alkyl peroxydes (LOO[•]), alkyl hydroperoxydes (LOOH) et alkoxydes (LO[•]) : Ils résultent de l'oxydation des AGPI par OH[•]. Leur propagation de proche en proche altère l'intégrité et la perméabilité membranaire (Beguel et al., 2013).

2.1.1.2 Sources

Les sources de production des ROS sont variées mais restent dominées par la mitochondrie dont les membranes interne et externe sont nettement impliquées. Dans les conditions physiologiques, la chaîne de transfert des électrons qui se déroule dans la membrane interne de

la mitochondrie est associée à une production modérée de $O_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 . Cette production est toutefois fonction de l'état métabolique de la mitochondrie, de la pression en O_2 et de la disponibilité de l'ADP. Ainsi, dans les phases de repos caractérisées par un ralentissement de la respiration et une faible disponibilité de l'ADP, ces deux espèces radicalaires sont produites à des taux élevés à cause de l'état de réduction majeure des composants de la chaîne respiratoire. A l'inverse, durant les phases actives de la respiration s'accompagnant d'un accroissement de la capture de l' O_2 et d'une disponibilité accrue de l'ADP, leur production est amoindrie et ce du fait de l'état d'oxydation majeure des composants de la chaîne respiratoire. Les phases d'anoxie qui se traduisent par une limitation de la fourniture en O_2 et une absence de respiration se traduiront quant à elles par une inexistence de réduction incomplète de O_2 en $O_2^{\cdot-}$ (Cadenas & Davies, 2000). Les trois sites de production de $O_2^{\cdot-}$ dans la chaîne de transport des électrons sont le complexe I, le complexe II et le complexe III. Ce dernier représente le site principal de production dans les conditions métaboliques normales (Finkel & Holbrook, 2000). La monoamine oxydase de la membrane externe de la mitochondrie va catalyser la désamination oxydative des amines biogéniques conduisant à une production massive de H_2O_2 . Ceci contribue à majorer les concentrations en ROS dans la matrice mitochondriale et le cytosol de la cellule (Cadenas & Davies, 2000).

La stimulation excessive des NADPH oxydases (NOX), complexes multimériques retrouvés de façon ubiquitaire dans les membranes cellulaires, entraîne une surproduction de $O_2^{\cdot-}$. Le *Tumor necrosis factor α* (TNF- α), l'*Interleukin -1 β* (IL-1 β), la chaîne respiratoire mitochondriale et la xanthine oxydase sont décrits comme étant des stimulateurs des NOX (I. T. Lee & Yang, 2012).

La xanthine oxydase catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique dans les conditions d'hypoxie et d'ischémie-reperfusion et cette réaction s'accompagne d'une production d' $O_2^{\cdot-}$ (Garait, 2006).

L'auto-oxydation de molécules tels que l'hydroquinone, l'adrénaline, la dopamine et les flavines génère d'importantes quantités de ROS et plus particulièrement d' $O_2^{\cdot-}$ (Garait, 2006).

La production d' $O_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 peut également survenir dans le cytosol à partir de la dégradation de la purine, des AG à très longues chaînes et à chaînes ramifiées dans les peroxysomes mais aussi du RE avec l'implication du cytochrome P450. (Circu & Aw, 2010).

Certains stimuli externes tels que les radiations ionisantes, les radiations UV, le tabac et la pollution atmosphérique peuvent aussi induire la production de ROS (Kehrer, 2000).

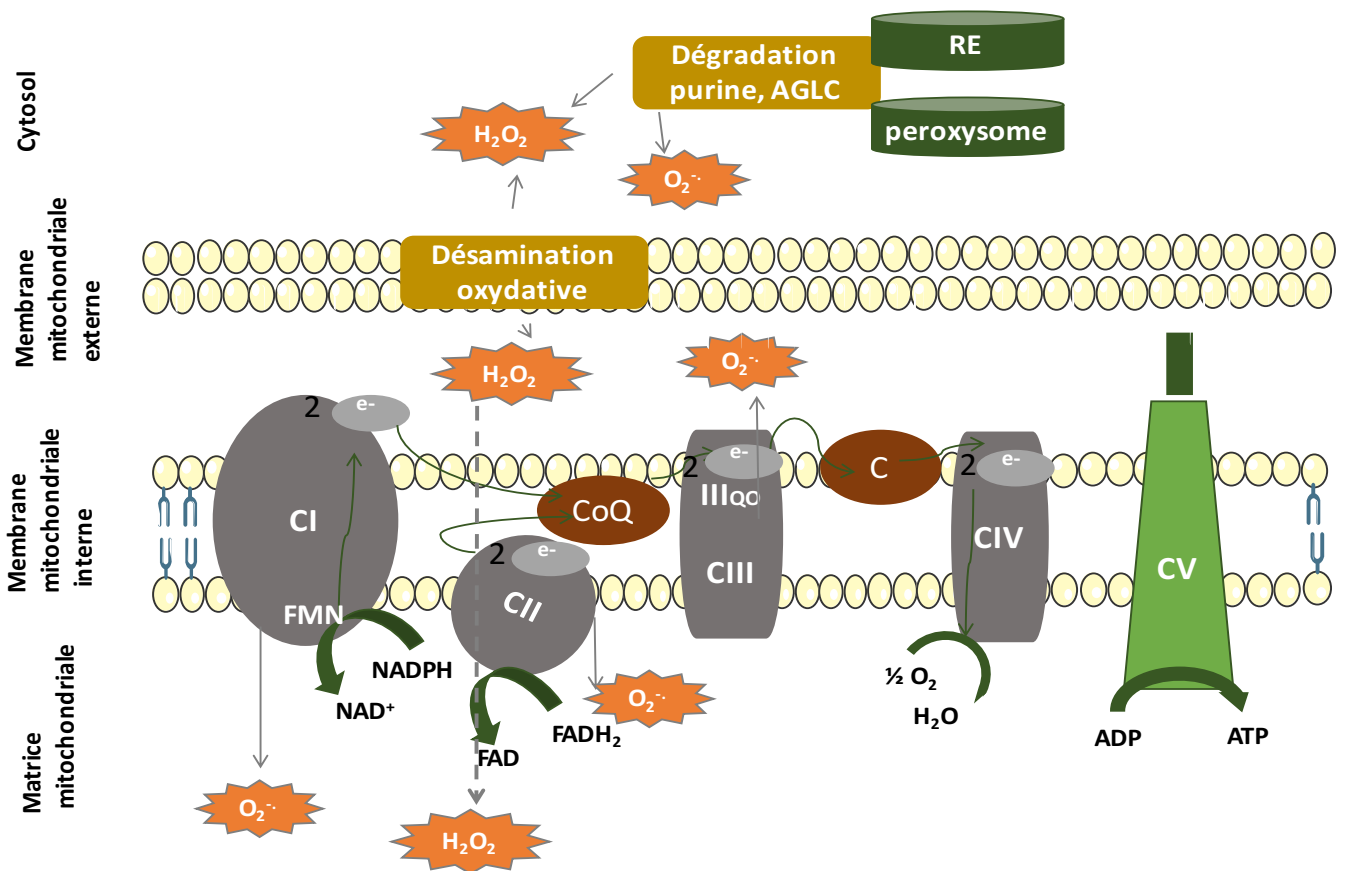


Figure 3. Principaux sites de production des ROS

C= cytochrome c, CoQ= coenzyme Q, RE= réticulum endoplasmique, AGLC= acides gras à très longue chaîne, FMN = flavine mononucléotide.

2.1.1.3 Effets délétères

La production de ROS à des taux modérés est un phénomène physiologique de survie cellulaire. En effet, ils interviennent dans la protection de l'hôte contre l'invasion des pathogènes mais également dans la régulation de l'apoptose et l'activation des facteurs de transcription. Cependant, leur surproduction conduit à des effets pathologiques se traduisant par des changements oxydatifs délétères des lipides, des protéines et de l'ADN mais également par une ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) de la mitochondrie. L'interaction des ROS avec ces molécules est favorisée par leur richesse en sites à densité électronique élevée qui peut correspondre soit à une abondance d'azote (ADN et protéines) soit à une abondance de doubles liaisons de carbone (AG et phospholipides) (Beguel et al., 2013)

Peroxydation lipidique : les ROS induisent une oxydation des AGPI qui du fait de leurs doubles liaisons constituent une cible préférentielle. A ce titre, LA est beaucoup plus sensible à cause de la présence de plusieurs groupements méthylène entre deux doubles liaisons. La peroxydation lipidique est une chaîne de réactions dont le point de départ est le détachement par $O_2^{\cdot -}$ ou OH^{\cdot} , d'un atome d'hydrogène des carbones situés entre deux doubles liaisons d'un AGPI des lipides membranaires (Nzengue, 2008). Le radical lipidique formé va réagir avec O_2 et générer un radical péroxyl (ROO^{\cdot}) qui va propager la réaction. Les métaux de transition interviennent dans la catalyse de cette réaction. Les peroxydes formés seront neutralisés par la glutathion peroxydase (GPx) et à défaut poursuivront leur oxydation et se fragmenteront en aldéhydes. Parmi les produits de dégradation sont les isoprostanes, le malondialdéhyde (MDA) qui altère la fluidité et la fonction membranaire, les acides thiobarbituriques, le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) et le 4-oxo-nonenal (NEB). Ce dernier réagit avec l'ADN pour former des adduits responsables de modifications mutagéniques chimiques des bases d'ADN (Douki, Odin, Caillat, Favier, & Cadet, 2004; S. H. Lee, Arora, Oe, & Blair, 2005). En l'absence d'inhibiteurs de la peroxydation lipidique tels que le coenzyme Q (CoQ_{10}) et la vitamine E, les produits de la peroxydation lipidique vont former des adduits de protéines et activer plusieurs voies de signalisation. Ils peuvent également former le complexe cytosolique glutathionyl-4-hydroxy-2-nonenal (GS-HNE) qui lorsqu'il persiste dans le cytoplasme contribue au SOx et donc à l'inflammation. Cette persistance relève de la présence de l'anticorps de la *Ral Binding Protein-*

I (RabBP-1 ou RLIP76). Cette protéine catalyse le transport ATP- dépendant du GSH et du GS-HNE permettant ainsi leur excrétion dans le milieu extracellulaire (Ortona, Margutti, Matarrese, Franconi, & Malorni, 2008). La peroxydation lipidique a pour conséquence majeure, la désorganisation de la structure des membranes cellulaires et une perturbation de leurs fonctions de barrière et de récepteur (St-Louis, 2011). Les vitamines liposolubles antioxydantes et le GSH jouent un rôle capital dans la prévention de la peroxydation lipidique et des effets adverses de ses métabolites.

Les lipoprotéines circulantes peuvent être aussi la cible d'attaques radicalaires aboutissant à la formation de LDL oxydées. Celles-ci sont captées par des récepteurs spécifiques des macrophages qui deviennent des cellules spumeuses impliquées dans le processus d'athérosclérose. Les LDL oxydées *via* la formation de complexes immuns activent la voie classique du complément et induisent la sécrétion de cytokines inflammatoires par les macrophages (Haleng et al., 2007).

Oxydation de protéines : Le phénomène d'oxydation altère les propriétés biologiques des protéines tout en accroissant leur vulnérabilité aux protéases. Les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine), les acides aminés basiques (arginine, lysine) et les acides aminés aromatiques (histidine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane) sont les cibles protéiques privilégiées des ROS. Les ponts disulfures issus de l'oxydation de la cystéine peuvent être régénérés en fonction thiol par le GSH ou la thioredoxine réduite *in vivo*. L'oxydation de la méthionine peut quant à elle, être réversible ou irréversible produisant respectivement du sulfoxyde de méthionine ou du sulfone de méthionine. L'hydroxylation est surtout l'apanage des acides aminés basiques et aromatiques (St-Louis, 2011). La modification oxydative la plus commune des protéines est la formation de dérivés carbonylés. Elle survient sous l'influence de cations métalliques tels que Fe^{2+} et Cu^{2+} . Cette oxydation se traduit soit par une cassure de liaisons peptidiques et une modification de la chaîne protéique soit par une modification des peptides par l'ajout de produits de la peroxydation lipidique (Levine, 2002). Il peut aussi s'agir de l'apparition de ponts bi-tyrosine intra et inter-chaînes. Le mauvais repliement des protéines tel qu'observé dans la FK, indépendamment du statut redox de la cellule, accroît la carbonylation protéique (Finkel & Holbrook, 2000).

Oxydation de l'ADN : L'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial peuvent subir des dommages oxydatifs. Néanmoins, l'ADN mitochondrial a une sensibilité plus grande à cette agression. Cette sensibilité relèverait de divers facteurs que sont l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial, sa proximité avec la membrane mitochondriale interne, ses mécanismes de réparation frustrés et sa structure circulaire qui le rend vulnérable aux mutations pathogènes (Finkel & Holbrook, 2000; Garait, 2006). Les lésions oxydatives de l'ADN se traduisent par des modifications des bases puriques et pyrimidiques, des cassures simples et double brin qui sont les plus délétères car menaçant la stabilité et l'intégrité du génome (Nassour, 2015). L'étude des processus endogènes de l'oxydation de l'ADN a permis d'identifier ses facteurs contributeurs. Il s'agit en l'occurrence d' OH^\cdot , de l'inflammation et du peroxy-nitrite (Aust & Eveleigh, 1999). La 8-hydroxy-2'-déoguanosine (8-OH-dG) est un produit classique de l'oxydation de l'ADN. Sa présence dans la matrice de l'ADN induit *via* l'action de l' α -polymérase, une incorporation mal codée des nucléotides dans les brins d'ADN répliqués. Il s'agit plus spécifiquement d'une transversion GC \longrightarrow TA. Les mutations de l'ADN qui en découlent sont en lien avec les perturbations de la structure macromoléculaire (Aust & Eveleigh, 1999).

Ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial : Le PTP est décrit comme un complexe multi-protéique localisé dans la membrane interne de la mitochondrie, jouant un rôle clé dans le processus d'apoptose. Le calcium de la matrice est le régulateur principal et l'inducteur le plus puissant de son ouverture. Le SOx, le statut redox des pools de GSH et des nucléotides pyridiniques, est impliqué dans l'ouverture de ce pore (Devun, 2008). Ceci donne lieu à une cascade d'évènements comprenant le gonflement de la mitochondrie, la rupture de la membrane mitochondriale externe et le relargage de molécules pro-apoptotiques notamment le cytochrome c et le Facteur Inducteur d'Apoptose (AIF) (Garait, 2006).

2.1.2 Défense antioxydante

La défense antioxydante regroupe toutes les molécules capables d'inhiber la production des ROS, de limiter leur propagation ou de provoquer leur destruction (Nzengue, 2008). Le système de défense antioxydante peut être subdivisé en trois groupes : les enzymes, les antioxydants non enzymatiques et les systèmes redox.

2.1.2.1 Antioxydants enzymatiques endogènes

Superoxyde Dismutase (SOD) : C'est une enzyme clé de la défense antioxydante qui intervient principalement dans la dismutation de $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 . C'est une métalloprotéine dont on distingue 3 isoformes selon la localisation chromosomique du gène, le type de métal qui y est associé, la structure quaternaire et la localisation cellulaire. La SOD1 et la SOD3 sont des dimères ayant pour cofacteurs le Cu et le Zinc (Cu/Zn –SOD). Le cuivre est indispensable au processus de dismutation tandis que le zinc est essentiel au maintien de la structure protéique. La SOD1 est retrouvée au niveau du cytosol mais pourrait être également présente dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. La SOD3 est extracellulaire et est sécrétée par les cellules musculaires lisses. Elle représente de ce fait la première ligne de défense de la paroi artérielle. Le cofacteur de la SOD2 est le manganèse (Mn-SOD). Chez les eucaryotes, cette enzyme est retrouvée sous forme tétramérique. Synthétisée dans le cytosol, elle est transportée dans la mitochondrie où elle se retrouve dans la matrice et sur la membrane interne (Beguel et al., 2013; McCord & Fridovich, 1969; Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001).

Glutathion peroxydase (GPx) : Son action est complémentaire à celle de la SOD en accélérant la dismutation de H_2O_2 en H_2O et O_2 . Ceci se fait parallèlement à l'oxydation du GSH en disulfure de glutathion (GSSG). La GPx est une sélénoprotéine ayant 5 iso-enzymes dont la plus abondante est la GPx1. Son taux est fonction de la teneur en sélénium et sa synthèse, hépatique et rénale. La phospholipide-hydroperoxyde-glutathion peroxydase est une forme de GPx associée à la membrane mitochondriale et qui joue un rôle spécifique dans l'élimination des peroxydes lipidiques (Garait, 2006; Haleng et al., 2007).

Glutathion réductase (GRx) : Son rôle essentiel est la régénération du GSSG en GSH en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons (Mardinoglu et al., 2015).

Catalase (CAT) : Elle agit pour transformer H_2O_2 en H_2O et O_2 et particulièrement dans les conditions où les concentrations en H_2O_2 sont importantes. Toutefois, elle peut être inhibée lorsque ces concentrations sont $> 100 \mu M$. La CAT est un homotétramère de 59kDa composée de 4 sous-unités protéiques dont la dissociation conduit à une inactivation de l'enzyme. Elle est abondante dans le foie et les globules rouges et se localise spécifiquement dans les peroxysomes (St-Louis, 2011).

2.1.2.2 Antioxydants non-enzymatiques

Glutathion (GSH ou γ - glutamyl-cysteinyl-glycine) : Ce tripeptide est le thiol majoritaire du compartiment intracellulaire et constitue la première ligne de défense contre les radicaux libres. Plusieurs propriétés lui sont attribuées dont un rôle majeur dans le contrôle du statut redox des groupements thiols en prévenant leur oxydation. Il intervient dans le piégeage des radicaux libres, dans la chélation des métaux et dans la protection de l'ADN. En effet, la production d' OH^\cdot résultant de l'interaction $\text{Cu}-\text{H}_2\text{O}_2$ de même que l'oxydation de l'ADN sont inhibées par le GSH en quasi-totalité (Spear & Aust, 1995). En outre, il sert de substrat à la GPx, permet de régénérer les vitamines C et E en leur forme active et prévient l'oxydation et l'alkylation des résidus de Keap 1. Ce dernier est associé au *nuclear factor (erythroid-derived 2) -like2* (Nrf2) et le maintient dans le cytosol en l'absence de SOx. Dans un contexte de stress, l'oxydation des résidus cystéine de Keap1 va permettre le détachement de Nrf2, sa translocation nucléaire puis sa liaison aux gènes de la réponse antioxydante. Le GSH mitochondrial préserve l'intégrité des protéines et des lipides mitochondriaux tout en contrôlant la production des ROS (Biswas et al., 2006; Masella et al., 2005; Pastore, Federici, Bertini, & Piemonte, 2003).

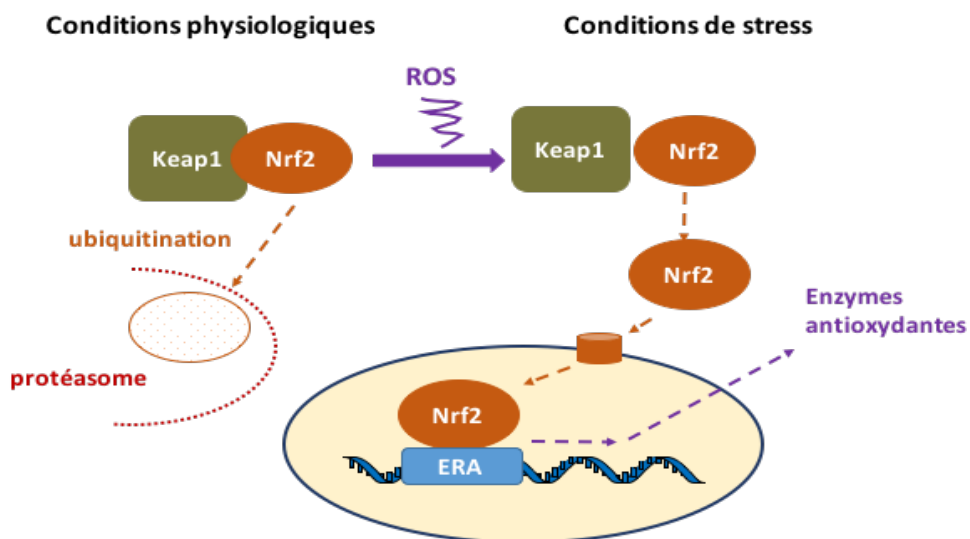


Figure 4. Induction de la réponse antioxydante par Nrf2

Nrf2 induit la synthèse d'enzymes antioxydantes par le biais de la transcription des gènes de la réponse antioxydante. Nrf2 = *nuclear factor (erythroid-derived 2) -like2*, ERA= éléments de la réponse antioxydante, Keap1= Kelch Like ECH Associated Protein 1

Ubiquinone ou Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) : c'est un dérivé benzoquinolique muni d'une chaîne latérale d'unités isopréniques, qui lui confère des propriétés de liposolubilité. Il est retrouvé au niveau de la membrane mitochondriale interne. Sa forme totalement réduite ou ubiquinol possède des propriétés antioxydantes avérées vis à vis de la peroxydation lipidique qu'elle inhibe. Son action se traduit par une diminution de la formation et de la propagation des radicaux peroxy et est synergique à celle de la vitamine E. En effet, l'ubiquinol majore la capture de la vitamine E et potentialise son action antioxydante en favorisant sa régénération de la vitamine à partir du radical α -tocophéroxyl. Toutefois, son action ne requière pas la présence de cette vitamine (Ernster & Dallner, 1995).

Vitamines C et E : La vitamine E (α - et γ - tocophérol) est liposoluble et protège les AGPI contre la peroxydation lipidique. Elle interagit avec les radicaux peroxy pour former des radicaux tocophéryls. Ces derniers sont pris en compte par la vitamine C et les radicaux ascorbyls qui en résultent sont neutralisés par le GSH. La vitamine C est quant à elle hydrosoluble et retrouvée dans le cytosol et les fluides extracellulaires. C'est un excellent piègeur de radicaux libres (Perricone, De Carolis, & Perricone, 2009).

Autres antioxydants non enzymatiques : Il s'agit des oligoéléments cofacteurs des antioxydants enzymatiques (sélénium, cuivre et zinc) mais également des caroténoïdes, de l'acide urique, de la bilirubine et des polyphénols (Haleng et al., 2007).

2.1.2.3 Systèmes redox

Il existe trois couples redox majeurs que sont le glutathion/disulfure de glutathion (GSH/GSSG), la thioredoxine/ thioredoxine oxydée ($\text{Trx (SH)}_2/\text{Trx-SS}$) et la cystéine/cystine (Cys/CySS). (Circu & Aw, 2012; Jones & Go, 2010).

GSH/GSSG qui représente le chef de file est présent dans la mitochondrie, le noyau, le RE et l'espace extracellulaire. Ce couple fait office de tampon redox et la perturbation de son homéostasie majore la susceptibilité oxydative (Hansen et al., 2006; Morel & Barouki, 1998).

$\text{Trx (SH)}_2/\text{Trx-SS}$ est retrouvé dans le noyau et constitue le partenaire principal de GSH/GSSG dans la régulation redox. Il est hautement responsable de la réduction et de la réparation des dommages oxydatifs des groupes thiols des protéines. Il participe à la dégradation des peroxydes

lipidiques, réduit les peroxyredoxines impliqués dans la réduction de H_2O_2 et régénère le radical ascorbyl. Sa participation à la régulation redox des facteurs de transcription *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) et *activator protein-1* (AP-1) est rapportée (Arnér & Holmgren, 2000) et implique la réduction des formes oxydées du *redox effector factor 1* (Morel & Barouki, 1998).

Cys/CySS est de localisation cytoplasmique et extracellulaire. La cystéine est le précurseur du GSH et joue un rôle capital dans la synthèse, la structure et les fonctions protéiques telles que la formation des sélénoprotéines (Brosnan & Brosnan, 2006; Ramirez et al., 2007).

Les coenzymes pyridiniques (NADH/NAD⁺, NADPH/NADP⁺, FADH₂/FAD) sont également impliqués dans les processus redox cellulaires. NADPH joue un rôle central dans la réduction de GSSG et Trx-SS. (Circu & Aw, 2010).

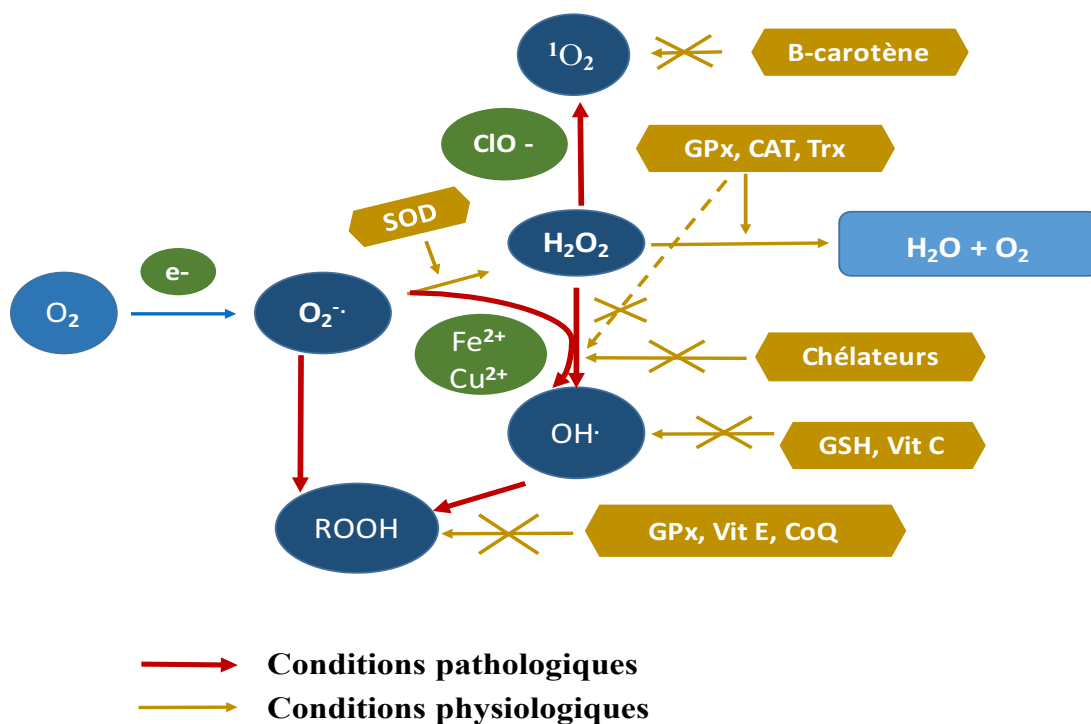


Figure 5. Mode d'action des principaux antioxydants

O_2 = oxygène, 1O_2 = oxygène singulet, $O_2^{\cdot-}$ = anion superoxyde, OH^{\cdot} = radical hydroxyl, H_2O_2 = peroxyde d'hydrogène, ROOH = lipoperoxydes, ClO^- = ion hypochlorite, SOD = superoxyde dismutase, GPx = glutathion peroxydase, GSH = glutathion, CoQ = coenzyme Q, CAT = catalase, Trx = thioredoxine (schéma adapté de Haleng, 2007) (Haleng et al., 2007)

2.2 SOx versus stress du réticulum endoplasmique dans la FK

Plusieurs causes potentielles ont été suggérées dans le stress de la FK et parmi elles, le stress du RE, le défaut inné du métabolisme du GSH, la malabsorption intestinale des lipides et vitamines antioxydantes liposolubles et l'inflammation (Back et al., 2004; Galli et al., 2012; Oudshoorn et al., 2006; Tirouvanziam et al., 2006).

Le RE est le site des modifications post traductionnelles telles que la glycosylation mais également du repliement et de l'assemblage des protéines (Moore-Gagné, 2012). Le stress du RE serait en lien direct avec les anomalies du processus de synthèse de la protéine CFTR telles que rapportées dans la FK. En effet, chez les patients homozygotes porteurs de mutations sévères, les protéines mal repliées peuvent rester séquestrées dans le RE et s'accumuler entre le RE et l'appareil de Golgi (Malhotra & Kaufman, 2007). Ces anomalies contribuent à l'installation du stress du RE et induisent l'activation de plusieurs voies spécifiques dont la voie de réponse des protéines mal repliées (*Unfolded Protein Response* ou UPR) qui est une réponse cellulaire programmée. Le stress du RE entraîne une liaison préférentielle de la chaperonne GRP78 aux protéines mal repliées et ce au détriment des protéines transmembranaires du RE à savoir IRE1, ATF6 et PERK. Ces protéines initient donc trois voies de l'UPR qui aboutissent à la réduction de la synthèse protéique et de la transcription des gènes des chaperonnes, au rétablissement du repliement fonctionnel des protéines et à la dégradation des protéines mal repliées (Lai, Teodoro, & Volchuk, 2007; Moore-Gagné, 2012). Les protéines mal repliées interagissent avec les chaperonnes calcium-dépendantes et altèrent l'homéostasie calcique (F. Antigny, Norez, Becq, & Vandebrouck, 2008). Leur accumulation dans le RE est associée à une génération de ROS et à une fuite calcique qui susciterait l'activation endogène du NF- κ B. En outre, l'augmentation du calcium intracellulaire est étroitement liée à l'activation de la PLA2 qui accroît la sortie de l'AA des membranes cellulaires et majore ainsi le déséquilibre en AGE rapporté dans la FK. L'AA va servir de substrat à la lipooxygénase et conduire, hormis la synthèse des éicosanoïdes, à la génération de ROS, à la peroxydation lipidique, à la chute du potentiel de membrane mitochondrial, à la baisse de la production d'ATP et à d'autres dommages oxydatifs mitochondriaux (Caro & Cederbaum, 2007; Rottner et al., 2009; Taha et al., 2010; Verhaege, 2007).

Certaines réserves sont cependant émises quant à l'implication du stress du RE dans la physiopathologie de la FK. En effet, les patients porteurs d'autres mutations sévères en dehors de la p.Phe508del, notamment les mutations de classe I et III, présentent également des tableaux d'infection et d'inflammation chroniques. Ces mutations n'entraînent pas de séquestration de protéines défectueuses dans le RE. En outre chez le sujet sain, la protéine CFTR est sujette à une dégradation massive et seulement 25% des protéines synthétisées atteignent le pôle apical des cellules épithéliales exocrines. Chez les patients hétérozygotes qui ne présentent pas de phénotype inflammatoire, cette dégradation atteint 85% (Machen, 2006). Ceci est contredit par d'autres résultats qui mentionnent que les sujets hétérozygotes porteurs d'une mutation du *CFTR* sur un seul allèle présentent des signes inflammatoires (Rottner et al., 2009).

2.3 SO_x dans l'intestin de FK

2.3.1 Sources potentielles

Physiologie et situation de l'intestin : La physiologie de l'intestin est favorable à la genèse d'un environnement pro-oxydant. En effet, l'épithélium gastro-intestinal s'auto-régénère tous les 4-5 jours (Circu & Aw, 2011) et le passage aux différentes étapes du cycle de vie s'accompagne d'une élévation du potentiel d'oxydation des couples redox GSH/GSSG et Cys/CySS (Jones, 2006; Schafer & Buettner, 2001). En outre, la position anatomique de l'épithélium intestinal, à l'interface entre la lumière digestive et l'organisme, l'expose aux dommages oxydatifs induits par les agents oxydants lumineux (Aw, 2005; Circu & Aw, 2012).

Dysrégulation de l'homéostasie du GSH : Les patients de FK présentent de faibles niveaux de GSH dans le plasma, les neutrophiles et la mitochondrie. La déplétion mitochondriale en GSH peut atteindre 43% dans les cellules épithéliales pulmonaires humaines et 85% chez des souris *knockout* (KO) pour le *CFTR* (Galli et al., 2012; Velsor, Kariya, Kachadourian, & Day, 2006).

Malabsorption intestinale : Elle induit une réduction considérable de la disponibilité d'antioxydants liposolubles tels que la vitamine E, les caroténoïdes, le CoQ₁₀ et les AG, en faveur d'un déséquilibre redox (C. Y. Huang et al., 2002; Oudshoorn et al., 2006).

ROS de sources extra intestinales : Les voies respiratoires des patients de FK constituent un site de production massive de ROS du fait de l'infection et de l'inflammation chroniques. Les neutrophiles, les cellules épithéliales alvéolaires de type II et les cellules bronchiques ciliées sont capables de produire des quantités significatives de ROS, principalement par l'activation du système des NOX (Day, van Heeckeren, Min, & Velsor, 2004). Ces derniers pourraient par voie systémique infiltrer l'intestin. Par ailleurs, la déplétion du GSH de la matrice mitochondriale telle que rapportée dans la FK, favorise la production de ROS par cette organelle. (Schonfeld & Wojtczak, 2008). Un lien a d'ailleurs été établi entre une déplétion de 50% du GSH matriciel et l'augmentation de la production de H₂O₂ (D. Han, Canali, Rettori, & Kaplowitz, 2003).

Microbiote intestinal : Les patients de FK sont sujets à des troubles digestifs divers et récurrents pouvant altérer potentiellement leur microbiote intestinal. Celui-ci joue un rôle essentiel dans la défense antioxydante intraluminaire (Circu & Aw, 2012). Une concordance des genres microbiens retrouvés dans les microbiotes intestinal et respiratoire des patients de FK est rapportée et pour certains, la colonisation intestinale précéderait l'apparition dans le tractus respiratoire (Madan et al., 2012).

2.3.2 Défense antioxydante de l'intestin

La défense antioxydante de l'intestin s'organise au niveau de trois compartiments que sont la lumière intestinale, l'épithélium et le milieu plasmatique. Elle fait intervenir une série de facteurs dont les actions intriquées assurent l'équilibre redox intestinal. Il s'agit notamment de l'alimentation, de la sécrétion biliaire, du microbiote intestinal, des couples d'oxydoréduction et des enzymes qui leur sont rattachées.

2.3.2.1 Lumière intestinale

Le GSH présent dans la lumière intestinale provient de l'alimentation, de la synthèse de novo et de la sécrétion biliaire qui correspond à 50% du GSH hépatique (Ballatori & Rebbeor, 1998). Il intervient dans le piégeage des métaux divalents, le maintien de la fluidité du mucus, la capture des lipides peroxydés et la réduction de leur transport lymphatique (Ballatori et al., 2009; Dahm & Jones, 2000; Hudson, 2004). Toute anomalie de la sécrétion biliaire pourrait donc influencer

l'équilibre redox de la lumière intestinale en perturbant le métabolisme du GSH. Par ailleurs, GSH/GSSG participe étroitement au rôle prédominant de Cys/CySS dans l'équilibre redox luminal (Dahm & Jones, 1994). Le microbiote intestinal participe dans une certaine mesure à la défense antioxydante de la lumière intestinale en prévenant la colonisation par les pathogènes, en supportant la nutrition intestinale et en régulant le système immunitaire du mucus. Il est également capable de produire à des concentrations millimolaires du sulfure d'hydrogène capable de prévenir l'inhibition de la cytochrome c oxydase mitochondriale, la production de ROS, le déséquilibre redox du GSH et le SOx (Leschelle et al., 2005). Le microbiote intestinal régule environ 10% des gènes impliqués dans la réponse immune, la prolifération cellulaire et le métabolisme. En outre, dans l'intestin grêle, le microbiote intestinal consommerait des acides aminés notamment de la glycine pour assurer sa croissance et sa survie. Ceci permettrait une régulation du métabolisme de ces acides aminés mais également du GSH (Mardinoglu et al., 2015).

2.3.2.2 Épithélium intestinal

Le GSH est le thiol majoritaire du compartiment intracellulaire dont il est le déterminant du potentiel redox. Il s'y trouve essentiellement sous forme réduite et son rôle dans la défense antioxydante se fait *via* l'action des enzymes GSH- dépendantes (Circu & Aw, 2012; Haleng et al., 2007). Le GSH cellulaire est composé de plusieurs pools localisés dans le cytosol, la mitochondrie, le RE et le noyau. Le potentiel redox diffère d'un compartiment à un autre en fonction des spécificités biologiques et métaboliques (Bass, Ruddock, Klappa, & Freedman, 2004; Dixon, Heath, Kim, Suh, & Hagen, 2008; Kemp, Go, & Jones, 2008). Ainsi, la mitochondrie possède le statut redox le plus bas du fait de son pH alcalin et est suivi du noyau, du cytoplasme, du RE et de l'espace extracellulaire (Dixon et al., 2008). Les enzymes GSH- dépendantes notamment GPx et GRx interviennent à différents niveaux de la défense antioxydante. Les isoenzymes de GRx participent à la réduction de GSSG (Haunhorst, Berndt, Eitner, Godoy, & Lillig, 2010) tandis que les 4 isoenzymes de la GPx sont impliquées dans la réduction de H₂O₂.

La Trx(SH)₂ intestinale est bien connue pour son rôle dans la réponse immune intestinale et dans l'immunité innée. Fortement exprimée au niveau du mucus intestinal, elle participe à la

défense antimicrobienne de la « human β -defensin 1 » (hBD-1) au niveau des épithélia humains. Elle est en effet reconnue comme étant un médiateur physiologique catalysant la réduction de ce peptide (Schroeder et al., 2011). En outre, son implication dans la régulation de l'équilibre redox se fait par le biais de la réduction de CySS (Godoy et al., 2011; Hansen et al., 2006).

Le CoQ₁₀ exerce un pouvoir inhibiteur puissant sur la peroxydation lipidique et cela lui confère une place de choix parmi les antioxydants cellulaires (Ernster & Dallner, 1995). Il exerce son action dans la mitochondrie et dans les membranes lipidiques en piégeant les radicaux oxygénés. Cette action antioxydante est bénéfique pour la mitochondrie, les PL membranaires, les AGPI sériques et les lipoprotéines de basse densité (LDL) (Oudshoorn et al., 2006).

2.3.2.3 Compartiment extracellulaire (plasma et environnement interstitiel)

La défense antioxydante dans ce compartiment est régie par les couples GSH/GSSG et Cys/CySS. Leur statut redox y est largement plus oxydé que dans le cytoplasme cellulaire si bien que la cystine (CySS) est considérée comme le déterminant majeur du potentiel redox de ce compartiment (Circu & Aw, 2012; Hansen et al., 2006). Le statut redox du GSH/GSSG extracellulaire est considéré comme le meilleur reflet de la défense antioxydante tissulaire, tandis que celui du Cys/CySS extracellulaire apparait réguler les fonctions cellulaires (Jones, 2006; Moriarty-Craige & Jones, 2004). (Go & Jones, 2005).

Le rôle prépondérant du GSH dans l'organisation de la défense antioxydante en général et de l'intestin en particulier met en exergue l'importance d'une protéine CFTR fonctionnelle dans le maintien de l'homéostasie redox des cellules épithéliales exocrines.

2.3.3 Thérapie antioxydante

Le recours aux antioxydants dans le traitement de la FK a été envisagé suite aux résultats d'études observationnelles ayant rapporté l'existence d'une association entre des niveaux bas d'antioxydants, une augmentation des marqueurs du SOx et une détérioration de l'état clinique des patients (Hakim et al., 2007; Lands, Grey, & Grenier, 2000; Winklhofer-Roob et al., 1995; L. G. Wood et al., 2001). Cependant, la supplémentation de routine en antioxydants a abouti à des résultats peu satisfaisants. En effet, les études d'évaluation mentionnent des taux bas de CoQ₁₀, d' α -tocophérol, de caroténoïdes, de vitamine C et de GSH. Parallèlement, les marqueurs

du SOx tels que le MDA et les 8-isoprostanes sont élevés et le statut clinique des patients y compris la fonction pulmonaire est en déclin (Back et al., 2004; Hakim et al., 2007; Iuliano et al., 2009; Lands et al., 2000; L. G. Wood et al., 2001) . D'autres interventions ayant consisté en une supplémentation ponctuelle en vitamine A ou vitamine E ont donné des résultats mitigés. En effet, les niveaux sériques des antioxydants étaient inchangés, bas ou augmentés au sein de la même étude (S. H. Huang et al., 2006). L'amélioration de la fonction respiratoire était discrète de même que la réduction des taux urinaires de 8-isoprostanes démontrant l'absence d'impact significatif de cette supplémentation sur le SOx (Sagel, Sontag, Anthony, Emmett, & Papas, 2011; L. G. Wood et al., 2003) .

Le faible succès de la thérapie antioxydante démontre que le SOx dans la FK va au-delà d'un déficit d'apport en lien avec la maldigestion et la malabsorption intestinale. Le fait que la supplémentation adéquate peine à contrôler la production des ROS pourrait en partie s'expliquer par l'existence potentielle de mécanismes complexes contribuant à la persistance du stress (L. G. Wood et al., 2001) En effet, la coexistence d'une augmentation des taux plasmatiques d'antioxydants et d'une présence évidente de marqueurs du SOx suscite plusieurs interrogations (Durieu et al., 2007; L. G. Wood et al., 2003). La dérégulation de l'homéostasie des couples redox majeurs semble être une explication probable étant donné que le déficit inné en GSH rapporté dans la FK pourrait considérablement altérer la signalisation et le contrôle redox avec ou sans changement dans l'équilibre pro-oxydants /antioxydants. En outre, cette perturbation du contrôle redox échappe à la capacité de protection des antioxydants (Hansen et al., 2006).

L'intestin de la FK présente une susceptibilité plus accrue au SOx qui découle d'une part d'un accroissement de la production de ROS en lien avec l'inflammation pulmonaire et le stress du RE, et d'autre part d'une détérioration de la défense antioxydante résultant de la déficience en vitamines liposolubles et de la dysrégulation de l'homéostasie du GSH. La déplétion du GSH mitochondrial altère les défenses antioxydantes de la mitochondrie qui pourrait constituer une source « incontrôlée » de ROS et donc un acteur central du déséquilibre redox rapporté dans la pathologie. L'échec de la thérapie antioxydante suggère d'ailleurs l'existence potentielle d'une source non encore accessible par les moyens utilisés. La vulnérabilité des lipides au SOx a conduit à évaluer son impact sur le métabolisme intestinal des lipides dans ce contexte afin d'évaluer sa participation aux anomalies lipidiques.

3 Inflammation

L'inflammation est la réponse de l'organisme à une « agression » qui peut être d'ordre physique (chaleur, froid), chimique ou biologique, en vue du maintien de son intégrité. Il s'agit le plus souvent d'une infection, d'une brûlure, d'une blessure, d'une réaction auto-immune ou d'une allergie. Dans les conditions physiologiques, ce processus est aigu ou suraigu, se déroule essentiellement dans le tissu conjonctif vascularisé et implique des modifications anatomiques et chimiques. Il peut cependant devenir chronique et durer plusieurs semaines ou mois. L'inflammation fait intervenir divers types cellulaires tels que les neutrophiles, les macrophages, les monocytes et les lymphocytes ainsi qu'une variété de médiateurs qui peuvent être plasmatiques et cellulaires. L'inflammation se traduit cliniquement par un syndrome dont les signes principaux sont la fièvre, la rougeur, l'œdème et la douleur. Les caractéristiques de la réponse inflammatoire sont fonction du type d'agent pathogène, de l'organe qui abrite l'inflammation et de la physiologie de l'hôte. Les altérations qui peuvent en découler sont fonction de son intensité et de sa durée (Hellal, 2007; ZERBATO, 2009).

La réponse inflammatoire se déroule classiquement en trois phases qui dans l'ordre chronologique sont la phase d'initiation, la phase d'amplification puis la phase de résolution et de réparation (ZERBATO, 2009). L'inflammation débute par une vasodilatation avec augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins. Ceci est favorable à l'infiltration de cellules inflammatoires telles que les monocytes et les neutrophiles qui eux sont destinés à phagocyter l'agent pathogène. Cette phagocytose s'associe ensuite à la libération de médiateurs qui attirent les macrophages phagocytaires sur le site de l'inflammation. Ces derniers vont libérer à leur tour des cytokines inflammatoires. Celles-ci augmentent l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales favorisant l'adhésion vasculaire et la migration tissulaire des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes circulants. Les chimiokines, puissants facteurs chimiotactiques des neutrophiles, sont produites par les macrophages et les cellules endothéliales sous l'action de $\text{TNF-}\alpha$ et $\text{IL-1}\beta$. Cette cascade d'évènements a pour but ultime d'éradiquer le pathogène en cause et de réparer les tissus (Goldsby, Kindt, Osborne, & Kuby, 2003).

3.1 Médiateurs de l'inflammation

Le processus d'inflammation fait intervenir, à chacune de ses étapes, une variété de médiateurs qu'on peut regrouper en deux groupes principaux : les médiateurs cellulaires et les systèmes d'activation plasmatique

3.1.1 Médiateurs cellulaires

Les médiateurs cellulaires de l'inflammation sont nombreux et essentiellement produits par les mastocytes, les leucocytes et les plaquettes sanguines. On y compte les éicosanoïdes, les cytokines, les ROS et le NO, les facteurs de croissance et les enzymes lysosomiales.

3.1.1.1 Éicosanoïdes

Les éicosanoïdes sont considérés comme les médiateurs lipidiques de l'inflammation. Ils dérivent de l'AA libéré des PL membranaires sous l'action de la PLA2. Cet AA est soumis à deux grandes familles d'enzymes que sont les lipooxygénases (LOX) et les cyclooxygénases (COX). Les LOX se servent de l'AA comme substrat pour générer les leucotriènes : LTB₄, LTC₄, LTD₄ et LTE₄. LTB₄ est un activateur phagocytaire et l'agent chimiotactique par excellence des polynucléaires. Les COX sont au nombre de deux : COX-1 et COX-2. Elles agissent différemment selon leurs propriétés. Ainsi, COX-1 est dite constitutive et intervient surtout dans le maintien de l'homéostasie. Elle génère à partir de l'AA des thromboxanes, TXB₂ et TXA₂ qui jouent un rôle clé dans l'agrégabilité plaquettaire et la vasoconstriction. Mais également des prostaglandines (PGI₂, PGE₂, PGD₂) qui interviennent dans la protection de la muqueuse gastro-duodénale et dans la régulation du flux sanguin rénal. La COX-2 est dite inducible. Son activation survient dans un contexte inflammatoire et les prostaglandines produites participent à la genèse de symptômes inflammatoires tels que la fièvre et la douleur. Il existe cependant certaines spécificités fonctionnelles au sein des éicosanoïdes. Ainsi, PGI₂ est capable d'induire une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire et un œdème. PGE₂, en plus des propriétés de PGI₂, exerce une action inhibitrice sur les lymphocytes T suppresseurs, majore la synthèse des immunoglobulines et réduit la production lymphocytaire d'IL-2. Elle stimule par ailleurs, l'action des médiateurs de la douleur (Blouin, Chaves, Bortoli, & Forest, 2006; Morin, 2010).

3.1.1.2 Cytokines

Les cytokines constituent un réseau de glycoprotéines incluant les interleukines (IL), les interférons, les facteurs de nécrose tumorale et les chimiokines dotées d'un pouvoir chimiotactique. Ce réseau découle d'une multiplicité de sources à la fois lymphocytaire, macrophagique, plaquettaire, endothéliale et épithéliale. Il exerce son action sur une grande variété de cellules cibles à travers la fixation à des récepteurs membranaires spécifiques. Leur synthèse et leur libération résultent de l'action de divers stimuli et leurs actions sont aussi bien inflammatoires qu'immunitaires. A ce niveau, elles font office de modulateur de l'intensité et de la durée de la réponse immunitaire (Goldsby et al., 2003; Leon & Zuckerman, 2005; Mukhopadhyay, Hoidal, & Mukherjee, 2006). Leur effet peut être pro-ou anti-inflammatoire.

Interleukines (IL)

Les IL qui jouent un rôle majeur dans la réaction inflammatoire sont IL-1, IL-6, IL-8 et IL-10.

IL-1 est essentiellement synthétisée par les monocytes et existe sous 2 formes IL-1 α qui a une action intracellulaire et IL-1 β qui est actif dans le compartiment extracellulaire. IL-1 β est synthétisée et stockée dans la cellule sous forme inactive en attendant son activation par IL-1 β convertase. IL1, à l'instar de ses propriétés multiples, est une interleukine pro-inflammatoire dont l'action est concentration-dépendante. Ainsi, elle induit à faibles concentrations une augmentation de l'expression des molécules d'adhérence au niveau des cellules endothéliales. Lorsque ses concentrations sont élevées, elle va induire de la fièvre par son action sur le système nerveux central et la production de protéine inflammatoires (fibrinogène, les facteurs du complément et la C-réactive protéine) par son action hépatique (ZERBATO, 2009). Elle est capable d'activer l'expression génique de plusieurs médiateurs de l'inflammation dont d'autres cytokines, PLA2, COX-2 et NO synthase.

IL-6 est produite sous l'action de divers stimuli dont les agents infectieux et leurs composants. Ses sources sont multiples : phagocytes, cellules dendritiques, fibroblastes et cellules endothéliales. Elle est pro-inflammatoire et stimule la synthèse hépatocytaire des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (le fibrinogène, la CRP, l'haptoglobine etc.) ainsi que les cellules de la lignée myéloïde par la moelle osseuse (ZERBATO, 2009). Elle inhibe cependant la production d'IL-1 et stimule les processus de réparation cellulaire. Ses propriétés

immunitaires comportent entre autres la stimulation de la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et la génération des lymphocytes T cytotoxiques.

IL-8 est une cytokine pro-inflammatoire produite par une variété de cellules tissulaires et sanguines. Sa production fait en général suite à une stimulation cellulaire par IL-1 et TNF- α . Elle est dotée d'un pouvoir chimiotactique visant à attirer et à activer les neutrophiles sur le site de l'inflammation. Ces derniers constituent sa cible préférentielle et elle exerce ses actions par le biais d'une induction des COX, des LOX et de NO synthase. Son action sur les autres cellules sanguines est moindre (Bickel, 1993).

IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire par excellence. Elle joue un rôle essentiel dans la limitation de la réponse immune de l'hôte aux pathogènes et préserve de ce fait l'homéostasie tissulaire. Produite par les lymphocytes Th2 et les monocytes. Elle inhibe l'action des protéines présentatrices d'antigènes et limite la production de IL-1, IL-6, IL-8 et TNF- α . (Iyer & Cheng, 2012)

Facteurs de nécrose tumorale (*Tumor Necrosis Factor* ou TNF) : Son rôle central dans les maladies inflammatoires chroniques est bien connu. Il en existe 2 formes : TNF- α qui agit de façon prépondérante dans l'inflammation et TNF- β . TNF- α exerce son action par l'intermédiaire de deux récepteurs spécifiques TNF-R1 et TNF-R2 dont la régulation est sous sa propre gouverne. Le promoteur de son gène contient des séquences de fixation pour les facteurs de transcription inflammatoire NF- κ B et *Activator Protein-1* (AP-1). Il est principalement sécrété par les monocytes, les macrophages et les neutrophiles, accessoirement par les lymphocytes, les mastocytes et les fibroblastes. Ses rôles dans les processus immunitaires et inflammatoires sont multiples et variés et parfois en synergie avec ceux d'IL-1. Ainsi, TNF- α active et induit sa propre production, stimule la production de plusieurs cytokines dont IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ , G-CSF et GM-CSF, de la NO synthase et des métalloprotéases, induit l'expression de COX, augmente la libération d'AGL, supprime la lipoprotéine lipase, diminue la catalase hépatique, augmente la production de O₂⁻ etc. (Hellal, 2007) .

Système interféron (IFN)

Il s'agit d'une famille de protéines dont la production cellulaire constitue la réponse à une infection virale, une stimulation immunitaire ou encore à un inducteur biologique ou chimique.

Les INF confèrent un état de résistance antivirale à la cellule en stimulant la synthèse de protéines inhibitrices de la réplication virale. Hormis cette aptitude qui leur est propre, ils sont capables de moduler la croissance et la différenciation cellulaire, la réponse immunitaire et le système hormonal. Ils peuvent cependant être toxiques et participer au développement ou à l'aggravation de certaines pathologies. On en distingue trois classes : IFN- α , IFN- β et IFN- γ . IFN- α ou IFN leucocytaire est essentiellement synthétisé par les lymphocytes, les macrophages sanguins et accessoirement par les lymphoblastoïdes. Sa production est principalement stimulée par une infection virale, mais peut également faire suite à une stimulation allogénique et un traitement par des ARN double brin synthétiques. Il en existe plusieurs sous-espèces. IFN- β ou IFN fibroblastique est synthétisé par les cellules de type fibro-épithélial. Sa production fait également suite à une infection virale et à un traitement par ARN double brin. IFN- γ ou IFN immun est produit par les lymphocytes T au cours d'un processus immunitaire ou par des mitogènes T (Lefèvre, 1989).

3.1.1.3 Espèces réactives d'oxygène et monoxyde d'azote

Au cours du processus inflammatoire, les neutrophiles produisent des ROS exerçant une action nécrosante et délétère sur les cellules endothéliales. Elles stimulent la synthèse de facteurs chimiotactiques tels que LTB₄ et le facteur d'activation plaquettaire (*Platelet Activating Factor* ou PAF) et inhibent les anti-protéases (Goldsby et al., 2003). NO régule le recrutement leucocytaire.

3.1.1.4 Facteurs de croissance

Ils sont impliqués dans la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales, dans la fibrogénèse cicatricielle et dans la régénération épithéliale. Ils exercent leurs propriétés par le biais d'action endocrines, paracrines et autocrines. La production de PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), d'EGF (*Epidermal Growth Factor*), du FGF (*Fibroblast Growth Factor*) et du TGF β (*Transforming Growth Factor*), résulte de l'activation macrophagique (Singh & Ramji, 2006).

3.1.1.5 Enzymes lysosomiales

Les enzymes lysosomiales contenues dans les granules primaires des polynucléaires comprennent la myéloperoxydase, le lysozyme, la PLA₂, les hydrolases acides, l'élastase, la collagénase etc. La lactoferrine, la gélatinase, l'histaminase, la phosphatase alcaline, l'activateur du plasminogène sont présentes dans les granules secondaires. Ces enzymes peuvent être déversées dans les vacuoles de phagocytose et intervenir dans la digestion de produits de phagocytose ou alors être déversés dans le milieu extérieur suite à la lyse des polynucléaires et induire des lésions tissulaires en promouvant l'inflammation. Elles ont aussi la capacité d'octroyer aux neutrophiles et aux macrophages des propriétés bactéricides au site de l'inflammation (Pham, 2006).

3.1.2 Systèmes d'activation plasmatique

Les systèmes d'activation plasmatique sont au nombre de quatre : Le système contact ou système des kinines, le système de coagulation-fibrinofomation, le système de la fibrinolyse et le système du complément (Russo-Marie, 1998)

3.1.2.1 Système des kinines ou système contact

Son importance dans le processus inflammatoire est moindre et la bradykinine est le principal médiateur qu'il sécrète. Celle-ci intervient aussi bien dans l'inflammation aiguë que chronique. La bradykinine induit une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire, la douleur, l'œdème, la contraction et/ ou le relâchement des fibres musculaires lisses et l'adhérence des polynucléaires aux cellules endothéliales. Ce système se compose de quatre protéines intervenant dans son activation : le facteur Hageman ou facteur XII, le facteur XI, le kininogène et la prékallicréine. Ses inhibiteurs sont l'alpha-1-antitrypsine (facteur XI), l'alpha-2- macroglobuline (kallicréine) et l'inhibiteur de la C1-estérase (kallicréine et facteur Hageman).

3.1.2.2 Système de coagulation- fibrinofomation et système de fibrinolyse

Leurs actions sont complémentaires au cours du processus de l'inflammation. L'activation du système de coagulation-fibrinofomation induit la formation de la thrombine qui entraîne la formation de fibrine à partir du fibrinogène. Cette activation est secondaire à une lésion tissulaire

à la surface des cellules endothéliales et des monocytes. La fibrinolyse est le processus de dissolution de la fibrine par le biais d'une protéolyse conduite par la plasmine. Cette dernière faisant partie des régulateurs dudit système est le produit de l'activation du plasminogène. Les produits de dégradation de la fibrine sont impliqués dans l'activation des cellules de l'inflammation.

3.1.2.3 Système du complément

Ce système est fondamental à défense anti-infectieuse et anti-inflammatoire. Il est composé d'une trentaine de protéines plasmatiques et cytomembranaires dotées de trois fonctions principales. La première est la capacité de marquer les microorganismes et les antigènes facilitant ainsi leur fixation sur des cellules munies de récepteurs membranaires du complément. La deuxième est d'attirer les phagocytes sur le site d'activation du complément et la troisième de procéder à la lyse des membranes cellulaires.

3.2 Facteurs de transcription de l'inflammation

3.2.1 Nuclear factor kappa B (NF- κ B)

3.2.1.1 Caractéristiques structurales

NF- κ B est une famille de complexes dimériques composés de protéines appartenant toutes à la famille Rel. Ces protéines possèdent en commun un domaine RHD (*Rel homology domain* indispensable à leur dimérisation, à leur localisation dans le noyau et à leur liaison à l'ADN grâce à un signal de localisation nucléaire (*Nuclear localization signal* ou NLS). Les protéines de la famille Rel sont au nombre de cinq et forment différents complexes par leur homo ou hétérodimérisation. Elles font l'objet d'une classification en deux groupes selon leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles : D'une part les protéines p50 et p52 issues du clivage protéolytique de leurs précurseurs cytoplasmiques qui sont respectivement p105 et p100 et d'autre part les protéines RelA, RelB et c-Rel qui ne proviennent pas de précurseurs mais qui possèdent des domaines d'activation transcriptionnelle. L'hétérodimère le plus abondant est

p50/p65. Sa liaison à sa protéine inhibitrice I- κ B dans le cytoplasme bloque sa translocation nucléaire (Bours, Dejardin, Bonizzi, Merville, & Piette, 1998; Russo-Marie, 1998).

3.2.1.2 Voies d'activation

Le phénomène de phosphorylation régule l'activité d'une variété de facteurs de transcription dont NF- κ B (Russo-Marie, 1998). Ainsi, l'activation de NF- κ B va découler d'une phosphorylation de son inhibiteur I- κ B sous l'action du complexe I- κ B kinase (IKK). Ce dernier possède 3 sous unités : IKK α , IKK β et IKK γ encore appelé *NF- κ B essential modulator* ou NEMO. A l'inverse des deux premières, IKK γ est dépourvue d'activité kinase (Martel, 2010). La famille I- κ B est composée de sept membres: I- κ B α , I- κ B β , I- κ B ϵ , I- κ B ζ , p100, p105 et Bcl-3. Ceux-ci sont munis d'un domaine de séquences répétitives « répétitions ankyrine » permettant leur interaction avec les protéines Rel de la famille NF- κ B (Bours et al., 1998).

Plusieurs stimuli activateurs de NF- κ B ont été identifiés parmi lesquels certaines cytokines inflammatoires telles que TNF- α et IL-1 β , des germes bactériens, viraux et parasitaires, les stress chimique et physique, le SO $_x$, les dommages de l'ADN, des mitogènes et des facteurs de croissance. Le type de stimuli va déterminer la voie d'activation de NF- κ B et le type de la sous-unité de IKK impliquée. Ainsi, les stimuli inflammatoires et infectieux empruntent la voie « classique » et entraînent l'activation de IKK β . Celui-ci induit la phosphorylation d'I- κ B α au niveau des sérines 32 et 36 puis son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. La translocation nucléaire qui s'en suit va permettre à NF- κ B d'induire la transcription d'un grand éventail de gènes (Figure 5) dont celui de I- κ B α , son inhibiteur le plus fréquent. Les stimuli de la seconde voie dite « alternative » sont principalement la lymphotoxine B, le *B-cell activating factor* ou BAFF, le ligand CD40 et certains virus. Ils activent la sous unité IKK α qui phosphoryle p100 dont l'ubiquitination et le clivage génère p52.

Les ROS et les radiations UV utilisent une voie atypique d'activation de NF- κ B qui n'intègre ni l'activation d'IKK ni la dégradation d'I- κ B α (Gilmore, 2006; Hayden, West, & Ghosh, 2006).

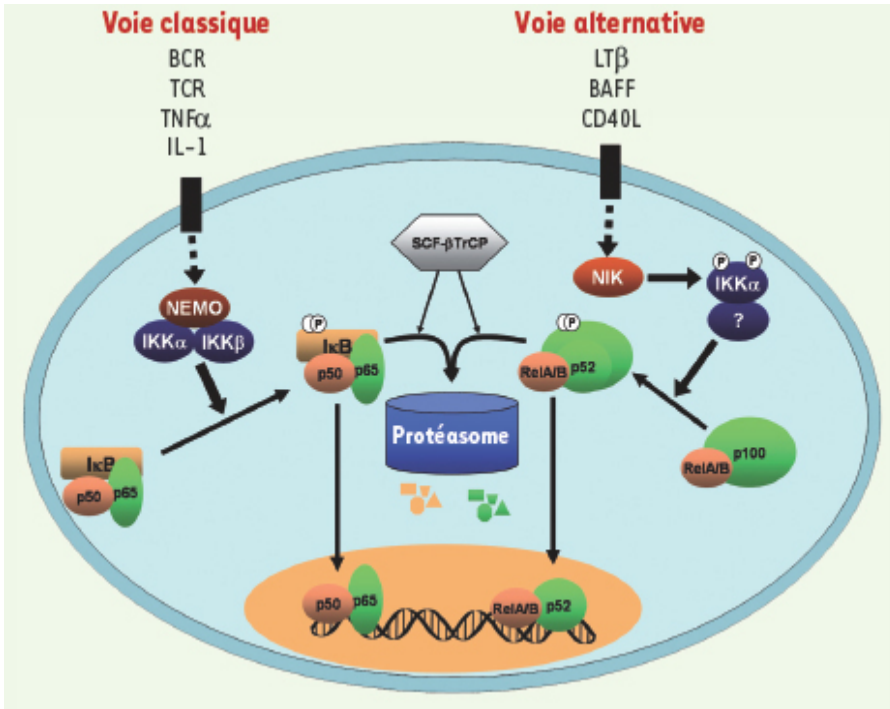


Figure 6. Voies d'activation de NF-κB

La voie classique induit l'activation du complexe NEMO-IKK qui aboutit à l'ubiquitination d'I-κBα et à sa dégradation. Dans la voie alterne, l'activation du complexe NIK conduit à la phosphorylation d'IKKα qui a son tour phosphoryle p100 qui sera ubiquitiné. BAFF= *B-cell activating factor*, BCR = *B cell receptor*, TCR = *T cell receptor*, IKK= *complexe I-κB kinase*, TNFα = *tumor necrosis factor α*, IL-1 = *interleukine 1*, LTβ = *lymphotoxine beta*, NIK = *NF-κB-inducing kinase* (Figure élaborée par Lobry et Weil 2007) (Lobry & Weil, 2007)

3.2.1.3 Propriétés fonctionnelles

NF-κB est ubiquitaire et est impliqué dans l'inflammation, l'immunité innée et adaptative, la balance survie cellulaire / apoptose, la prolifération, la réponse au stress, le développement et la réplication de certains virus (Bonnet, 2013; Martel, 2010) . Ses propriétés découlent de la multitude des gènes qu'il régule dont ceux de plusieurs cytokines inflammatoires telles que TNFα, IL-1, IL-2 et IL-6 (Russo-Marie, 1998), mais également de chimiokines, de facteurs de croissance, de molécules d'adhésion, d'enzymes impliquées dans la réponse au stress telles que COX-2 et NOS inductible etc. NF-κB régule certains gènes anti-apoptotiques et est incriminé

dans la longévité des neutrophiles au cours de la FK. Il retarde leur apoptose et ceci contribue à l'apparition des lésions délétères (Verhaege, 2007).

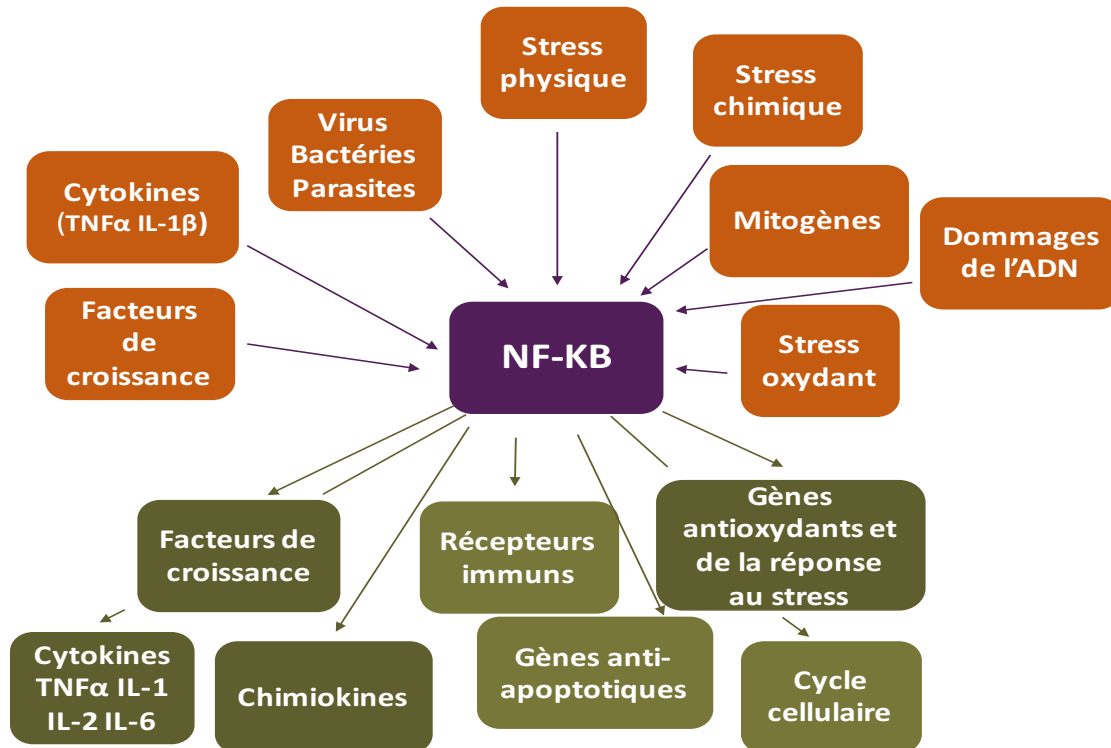


Figure 7. Régulation transcriptionnelle de NF-κB

3.2.2 Activator protein -1 (AP-1)

3.2.2.1 Caractéristiques structurales

AP-1 est un facteur de transcription nucléaire, constitué essentiellement de protéines appartenant aux familles Fos et Jun. La première se compose de c-Fos, FosB, *Fos related antigen* (FRA) 1 et 2. La seconde regroupe c-Jun, JunB et JunD (Coulon, 2001). On y inclut également les protéines de la famille Maf (*Musculoaponeurotic fibrosarcoma*) et de la famille ATF (*Activating Transcription Factor*) (Shaulian & Karin, 2002). Les facteurs AP-1 appartiennent à la superfamille bZIP dont la structure se compose d'une région basique de liaison à l'ADN (b) et d'un *leucine zipper* (ZIP) essentiel à leur dimérisation (Coulon, 2001).

Les protéines Jun et ATF sont capables de former des homo et hétérodimères tandis que les protéines Fos sont limitées à la formation d'hétérodimères. Les hétérodimères ATF/Jun ont une grande affinité pour les éléments de réponse de l'AMP cyclique (Shaulian & Karin, 2002).

3.2.2.2 Régulation

L'activation d'AP-1 résulte de l'action de stimuli divers incluant les cytokines, les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs, les hormones, des germes bactériens et viraux etc. Ils ont en commun l'induction de la cascade des *Mitogen activated protein kinase* (MAPK) qui, par le biais de la phosphorylation de substrats, entraîne l'activation d'AP-1. Il existe trois voies de signalisation des MAPK : *Extracellular-signal-regulated kinase* (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK1/2/3) et p38 (Shaulian & Karin, 2002). La voie d'activation sollicitée est fonction du type de stimuli. L'induction de la transcription des gènes codant pour les sous unités protéiques d'AP-1 tels que *c-jun* et *c-fos*, survient rapidement après une stimulation cellulaire. Suite à la transcription, certains stimuli tels que les radiations UV vont induire une stabilité plus grande des ARN messagers de *c-jun* et *c-fos*, permettant ainsi d'augmenter l'activité d'AP-1 via l'intensification de l'expression de C-Jun et C-Fos (Blattner et al., 2000). La régulation d'AP-1 concerne divers aspects dont la transcription, la stabilité du message, la traduction et la stabilité de la protéine. Cependant, les modifications post-traductionnelles et plus spécifiquement la phosphorylation permettent son intégration rapide à la signalisation cellulaire et l'activation de ses gènes cibles (Coulon, 2001).

3.2.2.3 Propriétés fonctionnelles

AP-1 est décrit comme un régulateur de l'inflammation mais également de la prolifération (métalloprotéinases de la matrice, cycline D1), de la transformation cellulaire (tumorigénèse), du développement embryonnaire, de la survie et de l'apoptose cellulaire (Coulon, 2001). Son rôle dans l'inflammation a été admis suite à la présence rapportée des sites d'AP-1 dans le promoteur de gènes codant pour des cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α) des métalloprotéases, des chimiokines, des molécules d'adhésion et des médiateurs lipidiques de l'inflammation (Verhaege, 2007).

3.3 Inflammation dans la fibrose kystique

3.3.1 Mécanismes étiologiques

La présence des marqueurs de l'inflammation a été largement rapportée dans les voies respiratoires de FK et l'infection chronique a longtemps été considérée comme l'étiologie principale (Cantin et al., 2007). Cependant, la mise en évidence d'une augmentation du niveau d'expression des molécules pro-inflammatoires en dehors de toute infection, ainsi qu'une infiltration pulmonaire de neutrophiles chez des fœtus de 24 semaines (homozygotes p.Phe508del.) démontrent une origine intrinsèque probable de cette inflammation. En effet, la molécule d'adhésion ICAM-1, la métalloprotéase MMP1, les chimiokines Groβ et Groy ainsi que le COX-2 ont une expression plus marquée dans les poumons des fœtus de FK (Verhaege, 2007).

Parallèlement aux voies respiratoires, l'intestin des patients de FK présente des caractéristiques en faveur d'un processus inflammatoire chronique. Les mécanismes causaux qui demeurent mal élucidés semblent découler davantage de la défectuosité génique. En effet la présence des marqueurs inflammatoires dans l'intestin de FK est parfois détectée même en l'absence de symptômes gastro-intestinaux (A. Munck, 2014). Il est aussi rapporté que les sujets porteurs d'une pancréatite chronique associée à une insuffisance pancréatique en dehors du contexte de la FK ne présentent pas d'inflammation duodénale (A. Munck, 2014). L'examen endoscopique de la muqueuse intestinale rapporte la présence de lésions œdémateuses et érythémateuses ainsi que des ruptures de la muqueuse et des ulcérations franches. En outre, la mesure de la calprotectine fécale révèle une élévation significative chez les patients de FK insuffisants pancréatiques. Leurs valeurs atteignent 258 µg/g de selles comparativement à des valeurs physiologiques inférieures à 50 µg/g (Werlin et al., 2010). La calprotectine est sécrétée par les neutrophiles et sa présence traduit une inflammation de la muqueuse intestinale. Cette inflammation intestinale chronique a été démontrée sur des modèles *in vivo* de souris knockout pour le *CFTR*. Ces dernières développent spontanément la maladie inflammatoire de l'intestin. En effet, l'analyse histologique de l'intestin confirme la présence d'une infiltration par des cellules immunitaires notamment des mastocytes et des neutrophiles (Norkina, Kaur, Ziemer, & De Lisle, 2004). Cette infiltration immunitaire a également été décrite dans la lamina propria

de patients de FK insuffisants pancréatiques. Elle se caractérise par la présence de cellules mononuclées exprimant des marqueurs inflammatoires tels que la molécule d'adhésion cellulaire ICAM-1, IL-2 et l'interféron-gamma (Raia et al., 2000). De même, le liquide de lavage intestinal de sujets FK, insuffisants pancréatiques et asymptomatiques révèlent une élévation significative d'albumine, d'IgG, d'IgM, d'élastase neutrophile, d'IL8 et d'IL1 comparativement aux sujets contrôle (Smyth, Croft, O'Hea, Marshall, & Ferguson, 2000). La modulation de l'expression génique des marqueurs de l'inflammation a été évaluée dans des modèles *in vivo* par microarray. Les résultats rapportent que la plupart des gènes régulés positivement ou négativement sont associés à l'inflammation (Norkina, Kaur, et al., 2004). Les autres gènes sont impliqués dans les voies métaboliques du métabolisme lipidique. Le déséquilibre en AGE dans la FK est pro-inflammatoire et les déficits en vitamine liposolubles notamment en vitamine E contribuerait à l'inflammation. Il existe une corrélation entre le statut en vitamine E, le statut en AGPI et l'inflammation. Ces études soulignent l'étroitesse du lien entre l'inflammation et le métabolisme lipidique dans cette affection (Sabharwal, 2016).

Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'identifier les mécanismes étiologiques de l'inflammation intestinale de la FK. Les troubles, hydro-électrolytiques induisent une perte du volume et de la fluidité des sécrétions qui associées à l'acidité anormale dans la lumière intestinale entraînent une accumulation de mucus. La digestion, l'absorption, la motilité et le microbiote intestinal sont affectés favorisant l'émergence de l'inflammation (A. Munck, 2014). Certaines hypothèses suggèrent que la protéine CFTR soit un régulateur négatif du NF- κ B : la première hypothèse stipule que le dysfonctionnement du CFTR entraîne une différenciation incomplète des cellules sécrétrices, inhibitrices de l'expression des cytokines impliquées dans la genèse de l'inflammation chronique et de la fibrose pulmonaire. La deuxième propose que l'inhibition du canal CFTR induise une augmentation de la translocation nucléaire de NF- κ B avec pour conséquence une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. La troisième décrit le canal ENAC comme un activateur potentiel de NF- κ B. Ainsi, sa régulation négative par le CFTR dans les conditions physiologiques, contribuerait à l'inhibition de ce facteur de transcription (Cohen & Larson, 2005; Lebowitz et al., 2004). D'un autre abord, la protéine CFTR mutée est elle-même décrite comme responsable de l'activation du NF- κ B et

d'AP-1. Ceci se ferait par le biais de protéines chaperonnes impliquées dans la voie d'activation de TNF- α puis de NF- κ B. Cette activation pourrait également découler d'une augmentation du calcium intracellulaire et des taux de céramides tels que décrits dans les cellules FK. Ces mécanismes impliqueraient également les kinases IKK et ERK (A. Garcia, Shankar, Murugappan, Kim, & Kunapuli, 2007; Knorre, Wagner, Hans-Eckart Schaefer, Colledge, & Pahl, 2002; Ogretmen & Hannun, 2004).

Dans ce contexte, le stress du RE et l'activation du NF- κ B qui lui est imputée pourraient donc être considérés comme une étiologie potentielle de l'inflammation.

Une autre voie proposée est celle du *peroxisome-proliferator-activated receptors* (PPAR). Leur l'expression réduite dans les tissus déficients pour la CFTR altère l'inhibition du NF- κ B et abouti à la survenue de l'inflammation (Ollero et al., 2004).

L'étroite interaction qui existe entre le SOx et l'inflammation sous-entend que l'un soit instigateur de l'autre et *vice-versa* (Cantin et al., 2007; Hansen et al., 2006). En effet, la présence massive de ROS décrite dans la FK est aussi reconnue comme une source d'inflammation. Les ROS sont capables d'activer plusieurs voies de signalisation incluant les facteurs de croissance, les protéines kinases, les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 et en définitive induire la transcription de gènes cibles de l'inflammation. Si l'activation des facteurs de transcription et leur translocation nucléaire requiert un signal oxydatif dans le cytoplasme, leur liaison à l'ADN des gènes régulateurs de l'oxydation et de l'inflammation exige au contraire un statut réduit dans le noyau. Ceci étant assuré par Trx (SH)₂ et facteur effecteur redox 1 (Ref1) (Allen & Tresini, 2000; Bloom, Dhakshinamoorthy, & Jaiswal, 2002).

Par ailleurs, les manifestations respiratoires de la FK ont été associées à des niveaux bas de GSH dans le liquide épithélial bronchique. L'augmentation des concentrations en GSH a également été décrite comme un moyen de défense efficace contre les dommages oxydatifs induits par les stimuli inflammatoires (Day et al., 2004).

Ces données conduisent à admettre que dans la FK, l'inflammation est constitutive et d'intensité modérée. Elle sera toutefois exacerbée par la survenue d'infections chroniques. L'activation du facteur de transcription NF- κ B constitue un maillon central dans le processus de cette inflammation qui pourrait toucher volontiers tous les organes exprimant le CFTR. En ce qui concerne l'intestin, la présence de l'inflammation chronique est démontrée même si les causes

ne sont encore clarifiées. Son lien direct avec la défektivité du CFTR semble probable et mérite d'être davantage exploré, et de même pour la voie du NF- κ B.

3.3.2 Caractéristiques

L'inflammation dans la FK est de type chronique caractérisée essentiellement par une neutrophilie massive, source importante d'IL-8 (L. G. Wood et al., 2001) et probablement d'IL-17 dont le lien avec la neutrophilie et l'excès de mucus a été rapporté (Brodie et al., 2011). La production d'IL-8 a au départ été rattachée à l'activation intrinsèque de NF- κ B mais elle n'est pas détectable en l'absence de pathogènes et l'ARNm d'IL-8 n'est pas non plus modifié en présence de cette activation (Joseph, Shukitt-Hale, Casadesus, & Fisher, 2005). La neutrophilie massive pourrait s'expliquer par la longévité anormale des neutrophiles due à l'activation du NF- κ B qui retarde leur apoptose. Elle contribue sous plusieurs aspects à l'entretien du SOx par la sécrétion des ROS (Cantin et al., 2007; Hansen et al., 2006).

4 Mitochondrie

4.1 Anatomie descriptive

Les mitochondries sont des organelles ovalaires localisées dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Elles sont de caractéristiques morphologiques variables mais de structure anatomique identique. Les mitochondries sont entourées de deux membranes, l'une interne et l'autre externe. Ces membranes délimitent trois compartiments que sont la matrice mitochondriale, l'espace intermembranaire et l'espace extra mitochondrial qui correspond au cytoplasme de la cellule.

Membrane mitochondriale externe : Elle a une structure lipoprotéique (60% de protéines et 40% de lipides) et contient des porines, protéines de 30 kDa qui y forment des canaux transmembranaires. Ces porines encore appelées *Voltage dependant anion channel* ou VDAC confère à la membrane mitochondriale externe une perméabilité accrue aux ions et molécules hydrophiles dont le poids moléculaire est inférieur à 10 kDa. Le passage transmembranaire des molécules de grandes tailles se fait par le biais d'un transport actif sous l'action des translocases transmembranaires (*Translocase of the outer membrane* ou TOM). L'ouverture des porines est

régie par le potentiel de membrane de la mitochondrie. Le versant cytosolique des porines sert de point d'ancrage aux protéines du cytosquelette et aux kinases cellulaires tandis que les cytokines s'en servent du côté de l'espace intermembranaire (Long, 2014) (Figure 9).

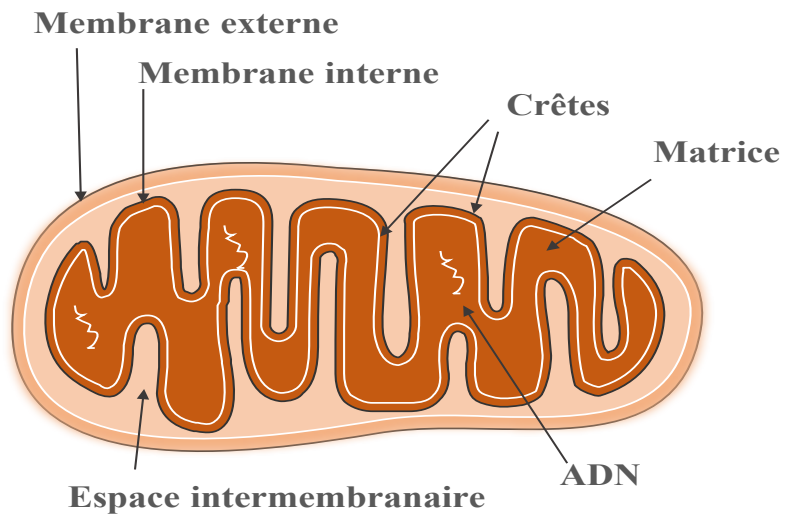


Figure 8. Anatomie de la mitochondrie

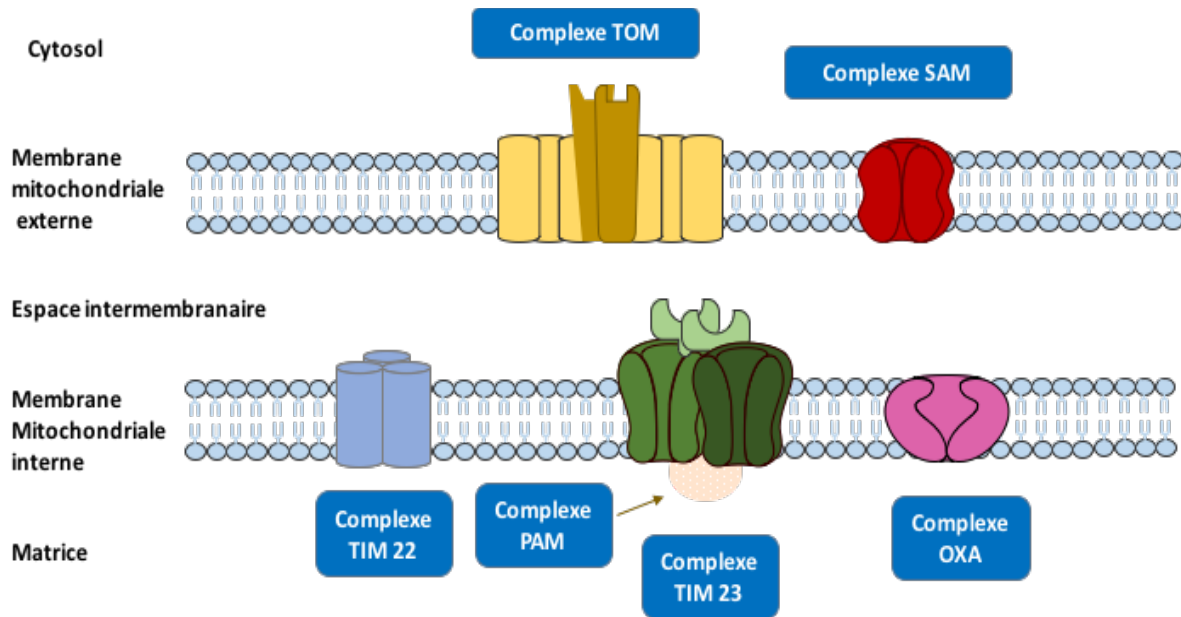


Figure 9. Transporteurs membranaires de la mitochondrie

Les complexes TOM et SAM assurent la translocation des protéines sur le versant cytosolique et les complexes TIM22, TIM23 et OXA prennent le relai sur le versant matriciel. TIM23 est lié au complexe PAM qui est un importateur d'ATPase contenant la hsp70 de la mitochondrie. TOM= *Translocator of the Outer Membrane*, TIM= *Translocator of the Inner Membrane*, PAM= *ATP-driven presequence translocase-associated motor*, SAM= *Sorting and Assembly Machinery*, OXA= *cytochrome oxidase activity*. (Figure adaptée de Bonhert 2007).

La membrane mitochondriale interne : Elle a également une structure lipoprotéique mais constituée davantage de protéines (80%) que de lipides (20%). Sa composante lipidique comprend 20% de cardiolipine. Elle forme des invaginations appelées crêtes dont on distingue deux types : les lamellaires et les tubulaires qui elles sont absentes du tissu adipeux brun. De nombreuses jonctions étroites relient la membrane mitochondriale interne à l'espace délimité par les crêtes. C'est une membrane rigide, quasi imperméable aux protons et aux métabolites et dont le transport transmembranaire est hautement sélectif (Long, 2014). C'est elle qui abrite la phosphorylation oxydative.

Le transport des protéines cytosoliques vers la mitochondrie va se faire au niveau de la zone de contact entre les membranes et par l'intermédiaire de translocases.

L'espace intermembranaire : Sa taille reflète l'intensité de l'activité respiratoire de la mitochondrie. Ainsi, une activité intense se traduit par une étroitesse de l'espace

intermembranaire. Sa composition s'apparente à celle du cytoplasme du fait de la grande perméabilité de la membrane mitochondriale externe (Long, 2014).

La matrice mitochondriale : Ce compartiment est le siège d'activités métaboliques dont le cycle de Krebs et la β -oxydation et contient de ce fait une grande variété d'enzymes. On y trouve également l'ADN mitochondrial. Le génome mitochondrial de l'humain est composé de 37 gènes qui codent pour 22 ARN de transfert, 2 ARN ribosomiaux et 13 protéines de la membrane interne (Long, 2014).

4.2 Biogénèse mitochondriale : rôle de PGC-1 α

Le *peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1-alpha* (PGC-1 α) ainsi que les deux autres membres de sa famille à savoir PGC-1 β et le *PGC-1 related coactivator* (PRC), se caractérisent par l'existence d'un domaine d'activation N-terminal près de motifs LXXLL riche en leucine. Ces derniers font office de médiateurs lorsque PGC-1 α interagit avec les récepteurs nucléaires, les domaines de reconnaissance de l'ARN et le domaine de liaison du facteur 1 des cellules hôtes (Scarpulla, Vega, & Kelly, 2012). PGC-1 α est reconnu comme étant le régulateur par excellence de la biogénèse mitochondriale. Il coordonne cette biogénèse en intervenant comme co-activateur dans la transcription de protéines codées dans le noyau puis incorporées dans la mitochondrie. Le contrôle transcriptionnel de la plupart de ces protéines, nécessaires à la synthèse de nouvelles mitochondries, est sous la gouverne des facteurs respiratoires nucléaires (*nuclear respiratory factors* ou NRF). Cependant, d'autres facteurs de transcription régulés par PGC-1 α tel que le YY1, y participent (Godin, 2014). Ces protéines sont importées par des complexes membranaires comprenant plusieurs sous unités et font l'objet d'un assemblage en polypeptides complexes avec le concours de chaperonnes. L'ADN mitochondrial pour sa part code pour trente sept protéines dont treize entrent dans la composition des complexes de la chaîne respiratoire tout en participant à leur fonctionnement. Hormis le complexe II (CII) qui est totalement codé par l'ADN nucléaire, les autres complexes résultent d'une expression bigénomique. PGC-1 α exerce également un contrôle transcriptionnel sur des protéines nucléaires intervenant dans la transcription du génome mitochondrial. De ce fait, il contribue à accroître la synthèse des protéines mitochondriales. L'activité transcriptionnelle de PGC-1 α est hautement régulée par des phénomènes post-transcriptionnels dont la

phosphorylation, la méthylation et l'acétylation. Son rôle dans la détermination des fonctions oxydatives cellulaires est bien connu et ceci justifie le rôle des capteurs d'énergie tels que l'AMPK et des sirtuines dans ce mode de régulation. Ces capteurs sont activés par des ratios élevés de AMP/ATP (hausse de la demande énergétique) et NAD/NADH (hausse de l'activité métabolique). Ils interviennent dans plusieurs voies de signalisation impliquées dans des processus physiologiques tels que la production de ROS, la prolifération cellulaire, la mort cellulaire et la production d'ATP (Godin, 2014). L'activation de l'AMPK induit une intensification de l'activité de PGC-1 α tandis que celle des sirtuines notamment SIRT1 se fait par le biais d'une désacétylation. Le défaut de PGC-1 α peut être partiellement comblé par PGC-1 β et ceci du fait du chevauchement de leurs cibles transcriptionnelles (Lin et al., 2002). Le double déficit n'est pas compatible avec la vie.

Outre la biogénèse mitochondriale, PGC-1 α interagit avec des facteurs de transcription spécifiques (PPAR α , RXR, ERR, Nrf-1 et Nrf-2) qui sont impliqués dans certaines fonctions mitochondriales majeures telles que la β -oxydation, le cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative (Scarpulla, 2012).

PGC-1 α a également été décrit comme un régulateur central du SOx qui induit son activation (Garcia-Quintans et al., 2016; Prakash & Kumar, 2016). Il régule le système de défense contre les ROS en augmentant les enzymes intervenant dans leur détoxification (Kukidome et al., 2006; Valle, Alvarez-Barrientos, Arza, Lamas, & Monsalve, 2005). Ce système de défense comprend les protéines découplantes UCP2 et UCP3, SOD1 et SOD3, la CAT et la GPx (St-Pierre et al., 2006). En prévenant le SOx, PGC-1 α neutralise une source d'inflammation.

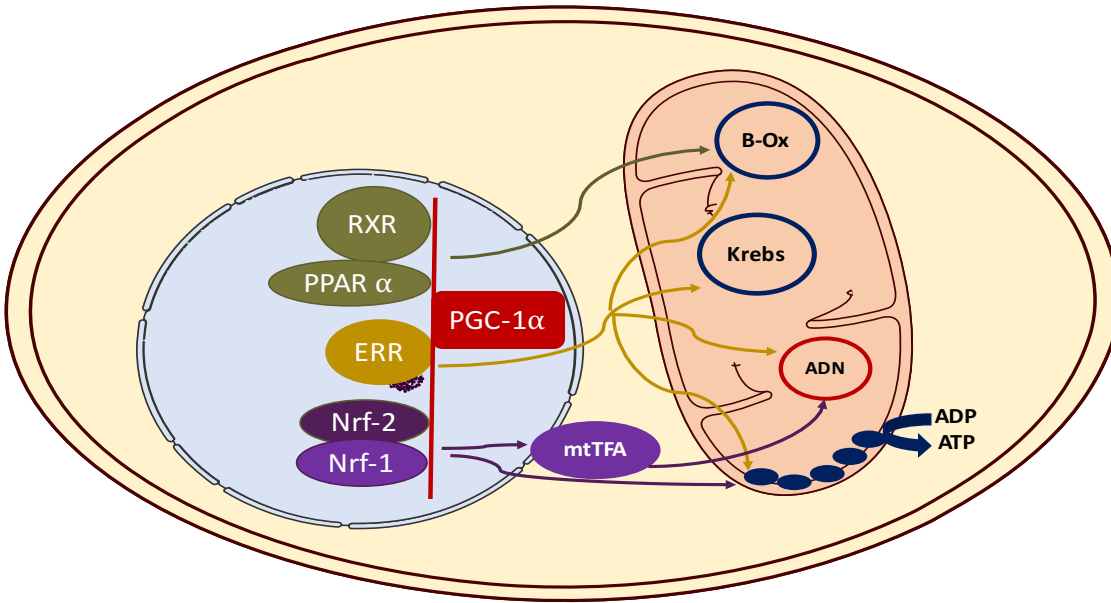


Figure 10. PGC-1 α et les facteurs de transcription des fonctions mitochondriales
 PGC-1 α interagit avec le complexe PPAR α -RXR (*retinoid X receptor*) pour réguler l'expression des enzymes intervenant dans la β -oxydation (B-ox) des AG. Il interagit avec les membres de la famille des ERR (*estrogen related receptor*) impliqués dans la régulation de diverses fonctions mitochondriales. Son interaction avec Nrf-1 et Nrf-2 contribue au maintien de l'ADN mitochondrial et à la synthèse des composants de la chaîne respiratoire.

4.3 Dynamique mitochondriale

Les mitochondries forment, à l'intérieur des cellules, des réseaux interconnectés et hautement dynamiques dont la biogénèse et la structure sont fortement influencées par les besoins cellulaires (Laura L Lackner, 2014). Leurs fonctions sont multiples et variées.

A l'instar de la production d'énergie, les mitochondries possèdent une multitude de fonctions (Tableau III) (Hoppins, 2014; Kashatus et al., 2011; Mitra, Wunder, Roysam, Lin, & Lippincott-Schwartz, 2009; Shutt, Geoffrion, Milne, & McBride, 2012; Stavru, Bouillaud, Sartori, Ricquier, & Cossart, 2011; Taguchi, Ishihara, Jofuku, Oka, & Mihara, 2007; Tondera et al., 2009).

Tableau III. Fonctions mitochondriales

FONCTIONS MITOCHONDRIALES					
Synthèse	Respiration	Métabolisme des macronutriments	Survie et mort cellulaire	Métabolisme calcique	Homéostasie cellulaire
Hormone stéroïdiennes Précurseurs des acides aminés	OXPPOS ATP Production de ROS Thermogénèse	B-oxydation Cycle de Krebs Cycle de l'urée	Progression du cycle cellulaire Apoptose	Rétention du calcium	Réponse au stress Réponse immune

La réponse optimale des mitochondries à ces différentes sollicitations qui régissent aussi bien les homéostasies mitochondriale et cellulaire impose aux organelles des changements conformationnels. Ces changements peuvent intervenir dans la forme, dans la répartition cellulaire et dans la structure de la membrane mitochondriale interne (Detmer & Chan, 2007). La dynamique mitochondriale a ainsi été définie comme l'ensemble de toutes les possibilités de changement dans l'architecture des réseaux mitochondriaux dans le temps (Rafelski, 2013). Elle permet aux mitochondries de s'impliquer dans divers processus cellulaires tout en ayant la possibilité de les moduler. La dynamique mitochondriale assure le maintien de l'intégrité mitochondriale et des interactions fonctionnelles et métaboliques entre la mitochondrie et les autres organites de la cellule. Cette dynamique est basée sur les interactions entre les phénomènes de fusion, de division (ou fission), de motilité et d'attachement des mitochondries (L. L. Lackner, 2013) ainsi que sur la mitophagie (Twig, Hyde, & Shirihai, 2008).

4.3.1 Dynamique de forme des mitochondries

La forme des mitochondries varie considérablement d'un type cellulaire à un autre. Cependant, à l'intérieur d'une même cellule, la mitochondrie peut adopter des formes variables. La dynamique de forme des mitochondries est régie par les phénomènes de fusion et de division qui déterminent leur forme, leur longueur, leur taille et leur nombre (Detmer & Chan, 2007). Ces phénomènes sont médiés par 4 GTPases de la famille des DRP : dynamin related protein. 3 protéines sont impliquées dans la fusion (mitofusine (Mfn)1, Mfn2 et Opa1) et 1 dans la division (Drp1) (Elgass, Pakay, Ryan, & Palmer, 2013; Escobar-Henriques & Anton, 2013; Head,

Griparic, Amiri, Gandre-Babbe, & van der Bliek, 2009; Praefcke & McMahon, 2004). La fusion favorise la communication et le partage de contenu entre les différents compartiments de la mitochondrie (Chen & Chan, 2010; Wikstrom, Twig, & Shirihai, 2009) et requiert le potentiel de la membrane mitochondriale interne (Legros, Anne Lombès, Frachon, & Rojo, 2002). La division facilite quant à elle le transport, la distribution et la dégradation médiée par le contrôle qualité de la mitochondrie (L. L. Lackner & Nunnari, 2009). Elle surviendrait aux sites de contact entre l'organelle et les tubules du RE. Ces derniers seraient des médiateurs de la constriction qui précède le recrutement de Drp1 (Friedman et al., 2011). La division mitochondriale donne naissance à deux organelles filles dont les potentiels de membrane sont différents. Celle dont le potentiel de membrane est intact retournera dans le cycle de fusion tandis que celle qui a une membrane dépolarisée aura la possibilité d'aller directement à la mitophagie ou de retourner au cycle de fusion en fonction du caractère transitoire ou permanent de sa dépolarisation membranaire. La mitophagie représente donc l'étape finale du processus de contrôle qualité de la mitochondrie (Twig et al., 2008). La division est souvent considérée comme l'étape cruciale du processus de contrôle qualité mais certains auteurs décrivent plutôt la fréquence et la sélectivité de la fusion comme étant les déterminants clés de ce processus (Mouli, Twig, & Shirihai, 2009).

Les taux relatifs de fusion et de division qui sont en équilibre dans les conditions normales modulent la connectivité du réseau mitochondrial (Nunnari et al., 1997). En effet, lorsque le ratio fusion/division est élevé, les mitochondries sont peu nombreuses, longues et hautement interconnectées (Bleazard et al., 1999). A l'inverse, en cas de baisse du ratio, les mitochondries sont plus nombreuses, sous forme de petites sphères ou de tiges courtes, le réseau mitochondrial est dit fragmenté (Detmer & Chan, 2007).

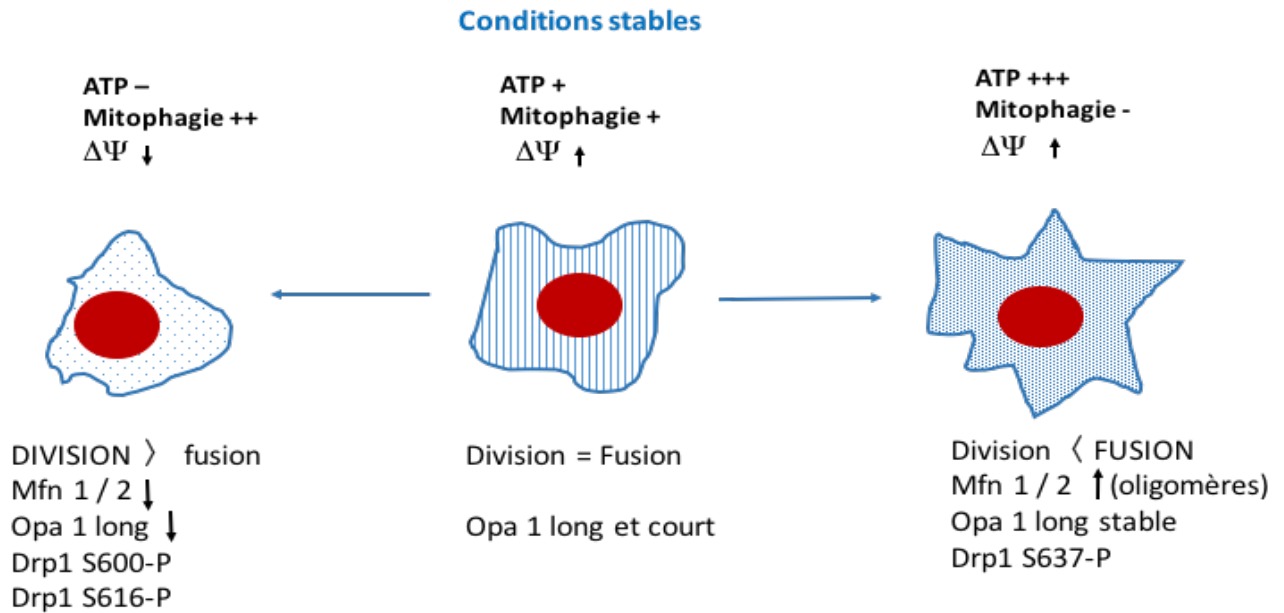


Figure 11. Dynamique de forme des mitochondries

La division s'accompagne d'une déstabilisation de Mfn1 / 2 et Opa 1 long et de modifications post-transcriptionnelles de Drp. Dans la fusion, l'oligomérisation des Mfns est accrue, le ratio Opa 1 long/ court est stable, l'activité de division de Drp diminuée. Drp = *dynamamin related protein*, Mfn = *mitofusin* (adaptée de Hoppins 2007) (Hoppins, 2014).

4.3.2 Dynamique de la distribution cellulaire des mitochondries

Les mitochondries sont des organelles mobiles. La position d'une mitochondrie à l'intérieur de la cellule est fonction de son attachement, de ses mouvements le long des voies dynamiques du cytosquelette, du changement de position de ces voies, de ses interactions avec le RE et la membrane plasmique, des interactions entre les tubules mitochondriaux (Anesti & Scorrano, 2006; Boldogh & Pon, 2006; L. L. Lackner, 2013). Les mitochondries sont généralement recrutées dans les régions cellulaires où la demande énergétique est importante (Chang, Honick, & Reynolds, 2006; Morris & Hollenbeck, 1993). Le potentiel de membrane de la mitochondrie influence également les modalités de sa migration. Lorsque le potentiel de membrane est élevé, la migration est préférentiellement antérograde et lorsque le potentiel est bas cette migration a tendance à être rétrograde (Miller & Sheetz, 2004).

4.3.3 Dynamique de la membrane mitochondriale interne

La membrane mitochondriale interne a été subdivisée en trois régions qui se distinguent au plan morphologique et fonctionnel : 1) la membrane de délimitation interne est très proche de la membrane mitochondriale externe et riche en protéines impliquées dans la translocation protéique à travers la membrane mitochondriale interne. 2) la membrane des crêtes est riche en protéines intervenant dans la phosphorylation oxydative. 3) les jonctions des crêtes sont des régions étroites qui séparent la membrane de délimitation interne de la membrane des crêtes. L'espace délimité par les membranes des crêtes est riche en cytochrome c dont la relocalisation durant l'apoptose serait fonction de la régulation de l'ouverture des jonctions de crêtes (Gilkerson, Selker, & Capaldi, 2003; Mannella, 2006; Wurm & Jakobs, 2006) .

4.3.4 Dynamique mitochondriale et efficacité énergétique

Lorsque des changements surviennent dans la demande énergétique et/ou dans l'approvisionnement en nutriments, l'organisme s'adapte en ajustant l'efficacité bioénergétique de la mitochondrie ainsi que sa capacité de synthèse d'ATP. L'efficacité bioénergétique de la mitochondrie c'est la production d'ATP par molécule de nutriments et la capacité de synthèse d'ATP de la mitochondrie est le taux de production d'ATP par unité de temps. Cette adaptation de l'efficacité bioénergétique et de la capacité de synthèse d'ATP à la disponibilité en nutriments varie selon les tissus et est étroitement liée à leur spécificité physiologique (Liesa & Shirihai, 2013). L'ajustement de ces processus énergétiques en réponse à une situation donnée se ferait par le biais de la dynamique mitochondriale. En effet, les variations architecturales qui relèvent de cette dynamique, seraient en elles même un mécanisme d'adaptation énergétique. La dynamique mitochondriale selon les variations du ratio apport nutritionnel / demande énergétique va privilégier un modèle architectural du réseau mitochondrial qui induira les variations énergétiques adéquates à la demande métabolique. L'architecture mitochondriale entretient des rapports très étroits avec l'équilibre entre la demande énergétique et l'approvisionnement en nutriments (Hyde, Twig, & Shirihai, 2010). Ainsi, lorsque l'apport nutritionnel est insuffisant pour répondre à la demande énergétique, la dynamique mitochondriale va privilégier une architecture interconnectée du réseau mitochondrial. La réduction des taux de division et l'augmentation du ratio fusion/division aboutit à l'élongation

et à la connexion des mitochondries (Karbowski, Norris, Cleland, Jeong, & Youle, 2006; Y.-J. Lee, Jeong, Karbowski, Smith, & Youle, 2004). A l'inverse, un apport nutritionnel excessif pour la demande énergétique, induit une inhibition de la fusion ainsi qu'une architecture fragmentée du réseau avec des mitochondries qui sont nombreuses sous forme de petites sphères et dispersées. Cette architecture mitochondriale conduit à une faible capacité de synthèse d'ATP et à une réduction de l'efficacité bioénergétique. L'énergie générée par l'oxydation des nutriments dans ce contexte fera l'objet d'une déperdition sous forme de chaleur via l'augmentation de la respiration découplante (Parker, Crichton, Vidal-Puig, & Brand, 2009).

4.4 Fonctions mitochondriales

La mitochondrie possède de multiples fonctionnalités dont la plus importante est la production d'énergie par le biais de la β -oxydation des AG et de la phosphorylation oxydative. Elle constitue le site de production par excellence de l'ATP, principale source d'énergie pour divers organes (Larrey, 2001; Lonlay, Djouadi, Bonnefont, Saudubray, & Bastin, 2002).

4.4.1 β -oxydation

Les AG à chaînes courtes et moyennes (*Short Chain Fatty Acid* ou SCFA et *Medium Chain Fatty Acid* MCFA) pénètrent directement dans la mitochondrie tandis que les AG à longues chaînes (*Long Chain Fatty Acid* ou LCFA) doivent être au préalable transformés dans le cytoplasme en Acyl-CoA sous l'action de l'Acyl-CoA synthase. Cette enzyme appartient à la famille des acylthiokinases qui sont des enzymes cytoplasmiques capables de lier les AG au Coenzyme A en utilisant l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP en adénosine monophosphate (AMP) et en pyrophosphate. L'Acyl-CoA synthétisé entre ensuite dans le cycle de la carnitine et est transformé en Acyl carnitine au cours de son passage transmembranaire mitochondrial. Cette transformation est catalysée par la carnitine palmitoyl transférase1 (CPT1). Dans la matrice mitochondriale, cet Acyl carnitine redevient un Acyl-CoA et sera oxydé en Acétyl-CoA *via* le cycle de la β -oxydation. Ce cycle encore appelé spirale de Linen est constitué d'une succession de quatre réactions enzymatiques :

Déshydrogénation par l'Acyl-CoA déshydrogénase : C'est la première réaction enzymatique. Son cofacteur est le *Flavin Adenine Dinucleotide* (FAD). Cette réaction génère le trans- Δ -enoyl-CoA et le FADH₂ et fait intervenir l'*electron-transferring flavoprotein* (ETF). Ce dernier est reconnu comme étant l'accepteur commun d'électrons des Acyl-CoA déshydrogénases de la mitochondrie (Mackenzie, Pedersen, Arent, & Henriksen, 2006). L'*electron transfer flavoprotein : ubiquinone oxidoreductase* (ETF-QOR) est reconnu comme étant un composant de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il forme avec l'ETF, une voie courte de transfert des électrons qui part de onze *flavoprotein dehydrogenases* au pool d'ubiquinone (CoQ) localisé dans la membrane mitochondriale interne (Ramsay, Steenkamp, & Husain, 1987; Ruzicka & Beinert; Steenkamp, 1988). Le flux d'électrons passe ensuite au complexe III (CIII) de la chaîne respiratoire, puis au cytochrome c, au complexe IV (CIV) et finalement à l'oxygène moléculaire (Watmough & Frerman, 2010). Le CoQ fait donc le lien entre la β -oxydation des AG et la chaîne respiratoire mitochondriale. .

Hydratation de l'enoil-CoA par l'enoil-CoA hydratase : Cette deuxième réaction enzymatique génère le 3-OH-acyl-CoA.

Déshydrogénation par la 3-OH-acyl-CoA déshydrogénase : Cette réaction utilise le *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (NAD) comme cofacteur.

Scission de la 3-OH-acyl-CoA en Acetyl-CoA : Cette réaction est catalysée par la 3-Ketothiolase

L'Acetyl-CoA généré peut subir une dégradation complète dans le cycle de Krebs au cours de laquelle sont générés du CO₂, NADH et FADH₂. Il peut également induire la formation de corps cétoniques dans le foie (Larrey, 2001; Lonlay et al., 2002). Le NADH et le FADH₂, coenzymes réduits, issus de la β -oxydation et du cycle de Krebs constituent des pourvoyeurs d'électrons aux complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et à leur accepteur final qu'est O₂. (Favier, 2003; Long, 2014).

4.4.2 Phosphorylation oxydative

Encore appelée chaîne respiratoire mitochondriale, la phosphorylation oxydative est une voie métabolique qui se déroule au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Elle génère de l'énergie à partir de la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP). La phosphorylation oxydative constitue la voie principale de génération de l'énergie tandis que la glycolyse fait office de voie accessoire (Long, 2014). Le transfert des électrons fournis par les coenzymes réduits est rendu possible grâce à une succession de réactions d'oxydoréduction entre les transporteurs de la chaîne respiratoire. Ces transporteurs sont principalement le CoQ, le cytochrome c et les centres fer-soufre. Le CoQ est une benzoquinone hydrophobe capable d'accepter un ou deux électrons et générer le radical semi-quinone ou l'ubiquinol. Le cytochrome c contient un atome de fer et est capable d'accepter un électron. C'est une protéine hémique soluble, liée à la membrane mitochondriale interne par des liaisons électrostatiques (Long, 2014). Ces transporteurs peuvent former avec des sous-unités protéiques, de grands complexes multi-protéiques enchâssés dans la membrane mitochondriale interne dans des proportions diverses. A cet effet, une molécule de CI s'associe à deux molécules de CII, trois de CIII et 7 de CIV (Long, 2014). La chaîne respiratoire consiste en cinq complexes enzymatiques.

Complexe I (CI) ou NADH ubiquinone oxydoréductase : C'est le plus gros des complexes avec un poids moléculaire de 980 kDa. Il se compose de deux bras dont un inséré dans la membrane interne et l'autre dans la matrice. Ce bras matriciel abrite le site de fixation du NADH. Ses cofacteurs sont la flavine mononucléotide (FMN), située près du site du NADH, et les centres fer-soufre (Long, 2014). Son substrat est l'hydrogène fourni par le NADH dont il catalyse l'oxydation pour générer NAD^+ . Cette oxydation se déroule sous l'action de la FMN réduite (Kussmaul & Hirst, 2006). Le NADH va donner deux électrons qui sont transportés de la FMN jusqu'au site de liaison de la quinone par l'intermédiaire de 8 centres fer-soufre. Le site de fixation de l'ubiquinone se situe à l'interface entre les deux bras du CI. L'hydrogène généré sera réduit au cours de son transport par le CoQ localisé dans les lipides membranaires. Le CI réduit l'ubiquinone en ubiquinol et utilise la différence de potentiel pour déplacer 4 protons H^+ vers l'espace intermembranaire (Ndiaye, 2014).

La roténone est l'inhibiteur le plus connu du CI. C'est un flavonoïde provenant des plantes qui est aussi un analogue hydrophobe de l'ubiquinone. Son mode d'action consiste à occuper le site de fixation de la quinone afin de bloquer le transfert des électrons du dernier centre fer-soufre à l'ubiquinone. Les autres inhibiteurs similaires sont le piéricidine A et l'Amytal. Il existe des analogues hydrophiles du NADH qui exercent aussi une action inhibitrice sur le CI. Il s'agit notamment de l'adénosine diphosphate ribose (Long, 2014).

Le CI est le plus large des complexes de la chaîne respiratoire et semble être le plus vulnérable aux anomalies structurelles et fonctionnelles des membranes mitochondriale (Schapira et al., 1990). Son inhibition ralentit sa capacité à capter l'hydrogène du NADH et à approvisionner le CoQ. Ceci a un retentissement sur la vitesse de formation de l'ubiquinol (CoQ réduit) qui constitue une source d'hydrogène pour le CIII. Ce dernier sera donc approvisionné uniquement par l'hydrogène provenant du CII et cette déficience altère la réduction du cytochrome c ferrique en cytochrome c ferreux. La cytochrome c oxydase (CIV), privée à son tour d'hydrogène, utilisera peu efficacement l'oxygène matriciel pour générer l'eau. Ces anomalies qui touchent les réactions d'oxydation se déroulant au niveau des complexes I, II et IV compromettent le pompage des protons et donc la synthèse de l'ATP. La déficience du CI a également été associée à une augmentation de la production d' $O_2^{\cdot-}$ et une induction de la MnSOD (Manfredi, Rovere-Querini, Brunelli, & Clementi, 2008; Pitkanen & Robinson, 1996).

Complexe II (CII) ou succinate ubiquinone oxydoréductase ou succinate déshydrogénase :

Ce complexe a la particularité d'appartenir aussi bien à la chaîne respiratoire mitochondriale qu'au cycle de Krebs. Il se compose de quatre sous-unités dont deux hydrophobes (SdhC et SdhD) et deux hydrophiles (SdhA et SdhB). Les sous-unités hydrophobes permettent au CII de se fixer dans la membrane interne et ils contiennent le cytochrome b, un groupement hème et le site de fixation de l'ubiquinone. SdhA est une flavoprotéine qui contient une FAD, site de fixation des acides carboxyliques. SdhB est une protéine composée de 3 centres fer-soufre. Les cofacteurs du CII sont le FAD et les centres fer-soufre. Son substrat est le succinate qu'il oxyde en fumarate. Cette oxydation fournit deux électrons par la réduction de FAD en $FADH_2$. Ces électrons sont par la suite transportés vers l'ubiquinone par l'intermédiaire des 3 centres fer-

soufre. L'hydrogène provenant de la transformation de FADH_2 en FAD est transporté par le CoQ (Long, 2014).

Les inhibiteurs du CII sont repartis en deux classes selon le site de liaison. Le malate, l'oxaloacétate (des intermédiaires du cycle de Krebs) et le malonate se lient au site de fixation du succinate tandis que la carboxine et le thényltrifluoroacétone au site de fixation de l'ubiquinone.

Complexe III (CIII) ou ubiquinone- cytochrome c oxydoréductase : C'est un homodimère dont chaque monodimère est constitué de onze sous-unités. Trois de ses sous-unités en l'occurrence le cytochrome b, le cytochrome c1 et une protéine fer-soufre dénommée protéine de Rieske, participent au couplage entre le flux d'électrons et le transfert des protons. Deux sous-unités protéiques Core 1 et Core 2 interviendraient dans la maturation et dans l'assemblage de ce complexe. Ses cofacteurs sont le cytochrome b et les centres fer-soufre. Son substrat est constitué des atomes d'hydrogène apporté par la forme réduite du CoQ dont il catalyse l'oxydation. Le CoQ permet le transfert des électrons entre CI, CII et CIII (Ndiaye, 2014). Dans le CIII, les électrons suivent un trajet circulaire appelé cycle Q qui aboutit à l'oxydation de l'ubiquinol en ubiquinone, au transfert de 4 protons H^+ vers l'espace intermembranaire et à la formation de deux cytochromes c réduits à partir de la consommation matricielle de deux protons H^+ . L'ubiquinol achemine les électrons au cytochrome c soluble situé dans l'espace intermembranaire (Long, 2014). Ce dernier transfère les électrons entre le CIII et le CIV (Ndiaye, 2014). Le CIII peut être inhibé par l'antimycine A, la stigmatelline et le myxothiazol. Ils inhibent le transfert des électrons.

Complexe IV (CIV) ou cytochrome c oxydase : c'est un homodimère de 400 kDa dont chaque monomère se compose de 14 sous-unités. La cardiolipine sert de lien entre les dimères. Ce complexe enzymatique a comme cofacteurs le cytochrome et deux noyaux hème (cytochrome a et cytochrome a₃). Chaque noyau est associé à un atome de cuivre (Cu_A et Cu_B). Le substrat de ce complexe est constitué des électrons apportés par le cytochrome c. Ces électrons catalysent l'oxydation du cytochrome c et sont transportés vers l'oxygène de la respiration pour former H_2O . La réduction de O_2 en H_2O se déroule dans un centre binucléaire formé par le cytochrome

a₃ et Cu_B. Cette réduction comporte deux étapes : la première consiste en une réduction des métaux du centre binucléaire par deux électrons issus de deux cytochromes c réduits et la seconde en une réduction rapide de O₂ qui va se fixer au niveau du centre binucléaire. Cette réduction nécessite l'apport de deux nouveaux électrons et de quatre protons. Ces différentes réactions s'accompagnent de la translocation de quatre protons H⁺ vers l'espace intermembranaire.

Les inhibiteurs du CIV se fixent tous au site de fixation de O₂. Il s'agit de NO, du monoxyde carbone (CO), de cyanides, de sulfides et d'azides (Long, 2014).

Complexe V (CV) ou mitochondrial ATPase : C'est une grosse protéine composée de deux domaines : Fo fixé dans la membrane interne et F1 globulaire et hydrosoluble retrouvé dans la matrice. Les différentes réactions d'oxydoréduction qui se déroulent dans les CI, CIII et CIV sont associés à un transfert d'anions d'hydrogène (H⁺) de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Il se crée donc un gradient électrochimique de protons entre ces deux compartiments. Ce gradient génère de l'énergie. Le CV va pomper ces protons de l'espace intermembranaire vers la matrice et utiliser l'énergie pour phosphoryler l'ADP en ATP. Le couplage entre le flux de protons et la synthèse de l'ATP se fait grâce à un mécanisme de rotation. Le CV est aussi capable d'hydrolyser l'ATP en ADP+Pi et libérer des protons. L'oligomycine est l'inhibiteur le plus connu du CV.

Dans certaines circonstances, le retour des protons vers la matrice mitochondriale se fera en dehors du CV et ce par le biais des protéines découplantes (*uncoupling protein* : UCP1, UCP2 UCP3, UCP 4 et UCP 5). Cette voie mène à la déperdition de l'énergie sous forme de chaleur (Ricquier & Bouillaud, 1998). Il existe deux types de découplage : le découplage est dit extrinsèque lorsque les modifications de la force protomotrice sont en lien avec la perméabilité membranaire favorisant la fuite de protons ou de cations et donc une diminution du gradient de protons. Dans le découplage intrinsèque, la baisse du rendement de la phosphorylation oxydative est en lien avec une baisse d'efficacité des pompes à protons appelée « patinage » (Long, 2014).

Dans les conditions physiologiques, la chaîne respiratoire mitochondriale génère des ROS dans des proportions faibles ou modérées (Liu, Fiskum, & Schubert, 2002). Cette production permanente justifie que la mitochondrie soit équipée d'un puissant système de défense antioxydante capable d'inhiber les effets néfastes des ROS. Ce système se compose de la MN-SOD, du GSH de la matrice, de la GPx, de Trx(SH)₂ et de la CAT (Haleng et al., 2007; Liu et al., 2002; Schonfeld & Wojtczak, 2008). La production d'O₂^{•-} a été rapportée au niveau des CI, CII et CIII. Le CI est un point d'entrée majeur d'électrons dans la chaîne respiratoire et représente une source substantielle des ROS cellulaires (Hirst, 2011; Murphy, 2009). En présence du NADH, la mitochondrie réduit O₂ majoritairement en O₂^{•-}. Le ratio NAD⁺/NADH détermine le nombre de molécules de CI ayant la forme totalement réduite de flavine ainsi que le taux d'occupation des sites de liaison. Il existe des liens directs entre l'état d'oxydation de NAD(P)H et la production de ROS par la mitochondrie (Kushnareva, Murphy, & Andreyev, 2002). Le site de la flavine au niveau du CI déterminerait les caractéristiques de la production d'O₂^{•-} et de H₂O₂ au niveau de la mitochondrie. Ce site est capable de produire des niveaux élevés de ROS au cours de la β-oxydation des AG et du flux inverse d'électrons provenant du pool réduit de CoQ (Perevoshchikova, Quinlan, Orr, Gerencser, & Brand, 2013). Le site de liaison de l'ubiquinone a aussi été identifié comme une source d'O₂^{•-} en présence de la force protomotrice et d'un gradient significatif du pH au cours du flux inverse d'électrons à partir du pool réduit d'ubiquinone (Treberg, Quinlan, & Brand, 2011). Il a été démontré que l'inhibition du CII conduit à une baisse de la production d'O₂^{•-} au cours du flux inverse d'électrons (Drose & Brandt, 2012). Le CIII participe à la production d'O₂^{•-} par l'intermédiaire de son site catalytique actif et durant l'oxydation de l'ubiquinone. Cette oxydation passe par une étape d'auto-oxydation de la semi-ubiquinone contrôlée par un équilibre fragile entre le potentiel de membrane, la disponibilité des formes réduites et oxydées de l'ubiquinone et le statut redox du CIII (Ghelli et al., 2013; Y. Han & Chen, 2013).

4.4.3 Apoptose

Le phénomène de mort cellulaire est physiologique et essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire. Il peut cependant survenir dans des conditions pathologiques. Ainsi, distingue-t-on la mort cellulaire programmée active de la mort cellulaire passive non programmée (Bettaieb, 2009).

4.4.3.1 Caractéristiques de la mort cellulaire

Les deux types de mort cellulaire non programmée sont la nécrose et l'oncose. L'oncose est caractérisée par la survenue d'un gonflement de la cellule immédiatement après la lésion causale et ceci est essentiellement dû à une augmentation de la concentration du sodium cytosolique. L'augmentation de la concentration du calcium est aussi incriminée entraînant un gonflement des organites cellulaires : mitochondries, RE, appareil de Golgi, mais également la formation de vésicules aqueuses à la surface cellulaire. La nécrose survient quant à elle à la suite d'un dommage tissulaire telle que l'hypoxie, l'infection et le traumatisme. Elle touche un ensemble de cellules au sein d'un tissu, la dégradation de l'ADN est aléatoire et elle s'accompagne d'un œdème cellulaire aboutissant à la lyse de la membrane plasmique. Le relargage du contenu cytosolique qui s'en suit provoque la lyse d'autres membranes cellulaires.

Il existe 3 types de mort cellulaire programmée active. Deux se déroulent sans l'intervention des caspases (*CysteinyI Aspartate- Specific protease*). La paraptose dont les mécanismes sont mal connus, se caractérise par l'apparition de vacuoles cytoplasmiques. L'autophagie qui est en cours de caractérisation peut revêtir deux aspects : l'autophagie de survie permet de maintenir le métabolisme, la production de l'ATP et de prévenir la survenue de l'apoptose. L'autophagie associée à la mort cellulaire se traduit par une surexpression génique de atg6 et de béclin 1. La protéine Béclin1 joue un rôle primordial dans la formation de l'autophagosome et son interaction avec Bcl2 est essentielle dans l'équilibre autophagie de survie/ autophagie de mort cellulaire. L'apoptose est la mort cellulaire programmée active qui nécessite l'intervention des caspases (Bettaieb, 2009).

L'apoptose touche le plus souvent des cellules individuelles au sein d'un tissu permettant le contrôle de leur nombre. Ainsi, les cellules dangereuses, surnuméraires et non fonctionnelles font l'objet d'une sélection puis d'une élimination. Les interactions qui s'établissent entre les signaux présents dans l'environnement de la cellule et les récepteurs internes vont permettre

d'initier et d'exécuter l'apoptose. Le programme dont l'exécution conduit à l'apoptose inclut des activations enzymatiques et l'expression de gènes pro-ou anti apoptotiques.

Le processus apoptotique induit des modifications morphologiques, génétiques et biochimiques. Les modifications morphologiques consistent en une condensation cytoplasmique, un rétrécissement du noyau, une condensation et une fragmentation de la chromatine puis une fragmentation irréversible de l'ADN nucléaire (Manfredi et al., 2008). La membrane plasmique quant à elle subit des déformations en doigts de gant qui vont aboutir à la formation de corps apoptotiques contenant du cytoplasme et des organites cellulaires. Les changements biochimiques vont se traduire par une translocation des résidus de phosphatidylsérine sur le versant externe de la bicouche lipidique (Loro, Vintermyr, & Johannessen, 2005). Toutes ces modifications visent la reconnaissance et la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages (S. Martin et al., 1995; S. J. Martin & Green, 1995).

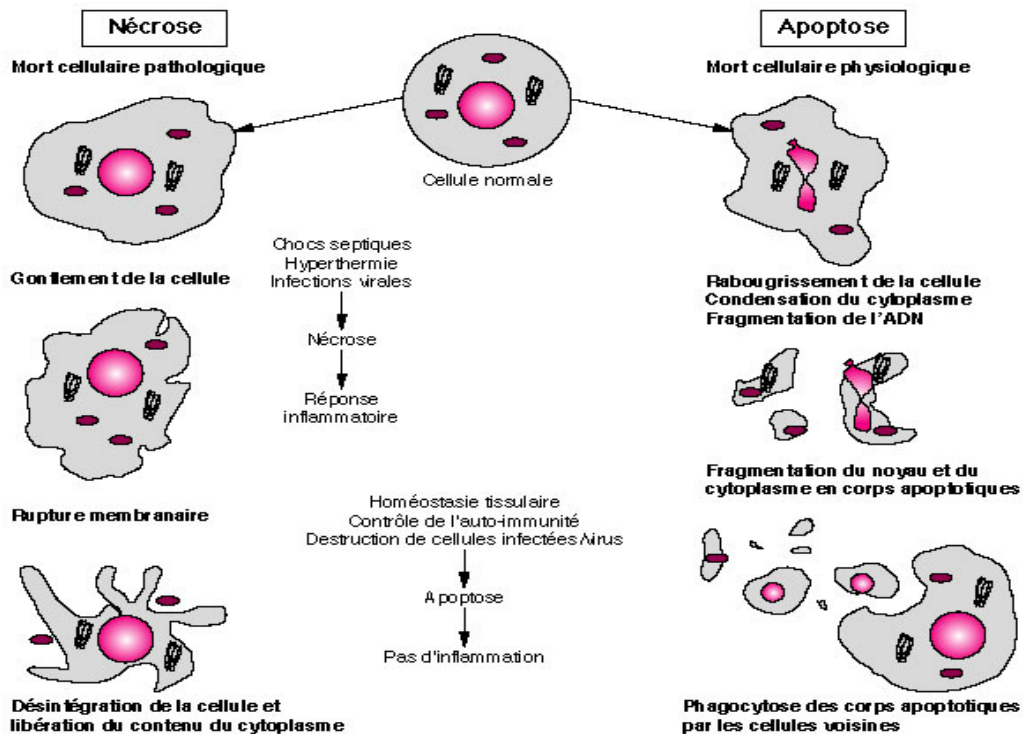


Figure 12. Représentation de la mort cellulaire par apoptose et par nécrose (Figure élaborée par Gougeon 2001)(Gougeon, 2001).

4.4.3.2 Voies de signalisation de l'apoptose

Il existe trois **voies** de signalisation de l'apoptose : la voie intrinsèque mitochondriale, la voie extrinsèque ou voie de récepteurs de mort, et la voie du RE. L'apoptose se déroule schématiquement en trois phases : la phase d'induction, la phase effectrice et la phase de dégradation.

Voie intrinsèque mitochondriale : La mitochondrie est une organelle essentielle dans la régulation du processus apoptotique. Sous l'influence de divers facteurs dont le stress, les dommages cellulaires, le choc thermique ou osmotique, les radiations ionisantes etc. la mitochondrie va faire l'objet de modifications incluant la perméabilisation membranaire associée à une chute du potentiel transmembranaire et une ouverture des pores mitochondriaux. Ces modifications qui retentissent sur la synthèse de l'ATP, entraînent un déversement du contenu de l'espace intermembranaire dans le cytosol et évoluent inexorablement vers l'apoptose. Les acteurs de cette voie intrinsèque sont le facteur inducteur d'apoptose (*Apoptosis Inducing Factor* ou AIF), la protéine Smac (*second mitochondrial activator of caspase*) et l'inhibiteur de l'inhibiteur cytosolique des protéines apoptotiques (IAPs) (HTRA2) et le cytochrome c. Ce dernier, lorsqu'il est libéré par la mitochondrie, s'associe au facteur d'activation des protéases apoptotiques Apaf-1 qui, sous l'action de l'ATP, s'unit avec la procaspase 9 pour former un complexe appelé apoptosome. A l'intérieur de ce complexe a lieu l'activation de la caspase 9 et le clivage des protéases effectrices de l'apoptose à savoir les caspases 3, 6 et 7 responsables de l'activation de la mort cellulaire (Bettaieb, 2009).

Les caspases jouent un rôle majeur dans le processus apoptotique. Leur activation induit le clivage de protéines cytoplasmiques et nucléaires impliqués dans le métabolisme cellulaire mais également dans la réparation de l'ADN et le cycle cellulaire. Les caspases de la phase d'initiation sont les caspases 8, 9 et 10 (Bettaieb, 2009).

La famille Bcl-2 est composée de plusieurs protéines dotées d'une séquence transmembranaire carboxyterminale. Celle-ci permet leur intégration dans la membrane externe de la mitochondrie, le RE et la membrane nucléaire. Les protéines de la famille Bcl-2 possèdent des propriétés pro ou anti-apoptotiques.

Les protéines anti-apoptotiques sont munies de domaines homologues au Bcl-2 (BH) dont on distingue quatre (BH1, BH2, BH3 et BH4). Ils sont indispensables aux fonctions anti-apoptotiques de Bcl-2. Toutefois, BH4 est spécifique à ce groupe.

Les protéines pro-apoptotiques tels que Bax et Bok présentent des similitudes au niveau des domaines BH1, BH2 et BH3. Leur translocation mitochondriale induit des changements mitochondriaux aboutissant à la libération du cytochrome c et à l'activation de la voie intrinsèque mitochondriale (Youle & Strasser, 2008).

Voie extrinsèque des récepteurs de mort cellulaire : La mise en œuvre de cette voie complexe résulte de l'activation de sept familles de récepteurs présents dans la membrane cytoplasmique. Ainsi distingue-t-on les familles Fas (CD95/APO-1), DR3, DR6, p75NGFR, DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2) et TNF-R1.

La famille du facteur de nécrose tumorale (TNF) est composée d'une vingtaine de membres qui, selon leurs structures, sont répartis en deux groupes. Le mode d'activation de l'apoptose diffère selon le groupe. Le groupe de récepteurs munis d'un domaine de mort (DD) intracellulaire transmettent le signal apoptotique *via* l'activation des caspases. A l'inverse, les récepteurs dépourvus du DD vont recruter des molécules activatrices de NF- κ B impliqué dans le maintien de la survie cellulaire (Bettaieb, 2009).

Voie du réticulum endoplasmique : le stress du RE est capable de susciter deux types de réponse. La réponse aux protéines mal repliées (UPR) aboutit à une préservation de la vie cellulaire tandis que la seconde, qui fait généralement suite à un stress plus intense, mène à l'apoptose (Bettaieb, 2009).

4.4.4 Rétention calcique

L'homéostasie du calcium fait intervenir les liens étroits qui existent entre le RE et le réseau mitochondrial. Les échanges ont lieu au niveau de micro-domaines situés entre ces organites. Au niveau du RE existent des zones très proches des mitochondries, dénommées *Mitochondria Associated ER Membranes* (MAM). Ces MAM correspondent à un assemblage hétérogène de protéines dans lequel sont retrouvées Mfn2, la *binding immunoglobulin protein* (Bip), la *glucose regulating protein 75* (Grp75) (chaperonnes du RE), R-IP3, VDAC1, et le récepteur sigma1

(R σ -1). Mnf2 est présent aussi bien sur la membrane mitochondriale externe que sur la membrane du RE. Il a été démontré *in vivo* qu'en l'absence de Mnf2, les mitochondries sont incapables de capter le calcium. Il en est de même lorsque Grp75 est ciblé par des ARNs d'interférence. Le couplage de R-IP3, protéine membranaire du RE et de VDAC, favoriserait le transport du calcium du RE à la mitochondrie. R σ -1 est un senseur de la concentration calcique du RE et intervient comme un régulateur du transfert du calcium du RE vers la mitochondrie (Ndiaye, 2014).

L'entrée du calcium dans la mitochondrie se fait en deux étapes. La première consiste à traverser la membrane mitochondriale externe en empruntant le VDAC. La seconde correspond au passage de la membrane mitochondriale interne par le biais d'un transporteur appelé *Mitochondrial Calcium Uniporter* ou MCU. Cette entrée calcique met à contribution la différence de potentiel découlant de la sortie des protons de la chaîne respiratoire mitochondriale. A l'inverse, l'efflux mitochondrial du calcium fait intervenir deux échangeurs d'ions que sont Na⁺/Ca²⁺ et H⁺/Ca²⁺. Une élévation de la teneur calcique matriciel provoque une ouverture du PTP mitochondrial (Ndiaye, 2014). Ainsi, la prévention de l'accumulation excessive de calcium dans la matrice et la préservation de l'homéostasie mitochondriale font intervenir la sensibilité de MCU au calcium cytosolique. En effet, il a été rapporté une inhibition de l'ouverture de MCU en présence de fortes teneurs de calcium dans le cytosol.

La capacité de rétention calcique correspond à la mesure de l'aptitude de la mitochondrie à retenir le calcium sous forme de phosphate de calcium à l'intérieur de la matrice mitochondriale. Elle peut être aussi définie comme la quantité de calcium nécessaire pour déclencher l'ouverture du PTP (Devun, 2008). Le stockage du calcium sous forme de précipités osmotiquement inactifs, permet à la mitochondrie de participer au tamponnage du calcium libre cytosolique et à la régulation des processus cellulaires calcium-dépendant. Dans les conditions physiologiques, la capacité de rétention calcique de la mitochondrie est très élevée. Son effondrement résulte de la réduction des métabolites énergétiques, d'un état d'oxydation ou encore d'une baisse du gradient de protons. Dans ces conditions, la surcharge calcique induit le déclenchement de la perméabilité transitoire de la mitochondrie. L'augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale interne qui s'en suit conduit à la perte de la force protomotrice, à une expansion

osmotique de la matrice, à une rupture de la membrane externe puis une libération du cytochrome c (Hansson et al., 2008).

4.5 Caractéristiques mitochondriales dans la fibrose kystique

La mitochondrie dans la FK revêt des caractéristiques spécifiques ayant fait l'objet de description dans plusieurs travaux. En effet, des études *in vitro* menées sur cellules épithéliales respiratoires de FK (p.Phe.508del) ont rapporté l'existence d'un réseau mitochondrial fragmenté et dispersé, une dépolarisation puis une baisse du potentiel transmembranaire et une réduction de la capacité de rétention calcique de la mitochondrie (Fabrice Antigny et al., 2009). Des anomalies de la chaîne respiratoire mitochondriale et plus spécifiquement la perte sélective de la fonctionnalité du CI a été rapportée dans la FK. L'inhibition du CI couplée avec la suroxydation du NADPH serait la conséquence d'un déséquilibre redox mitochondrial suite à une surproduction de ROS et à une déplétion du GSH mitochondrial (Kelly-Aubert et al., 2011). La faible teneur du GSH mitochondrial semble être davantage liée à la réduction du nombre de transporteurs du GSH plutôt qu'à une défectuosité de transport entre le cytosol et la matrice (Hansen et al., 2006; Kelly-Aubert et al., 2011). La surproduction de ROS a été associée à des modifications de la fluidité de la membrane mitochondriale interne augmentant la capture de l'O₂. La perte fonctionnelle du CI a également été rattachée à la faible expression du gène mitochondrial codant la sous-unité *MTND4* du CI. Cette dernière étant responsable de l'assemblage et de l'activité dudit complexe (Valdivieso et al., 2012). Il existe, en outre, une réduction de la cinétique du CI chez les patients de FK comparativement aux sujets hétérozygotes et sains (Shapiro, Lam, & Feigal, 1982). L'association entre le défaut du CFTR et les altérations fonctionnelles du CI est donc effective.

Des explorations plus approfondies de la mitochondrie sont nécessaires dans la FK. En effet, la place de cette organelle dans la physiopathologie du SOx dont l'implication dans la FK est admise, en souligne l'intérêt. La connaissance de ses caractéristiques dans l'intestin permettra d'améliorer la compréhension des anomalies décrites.

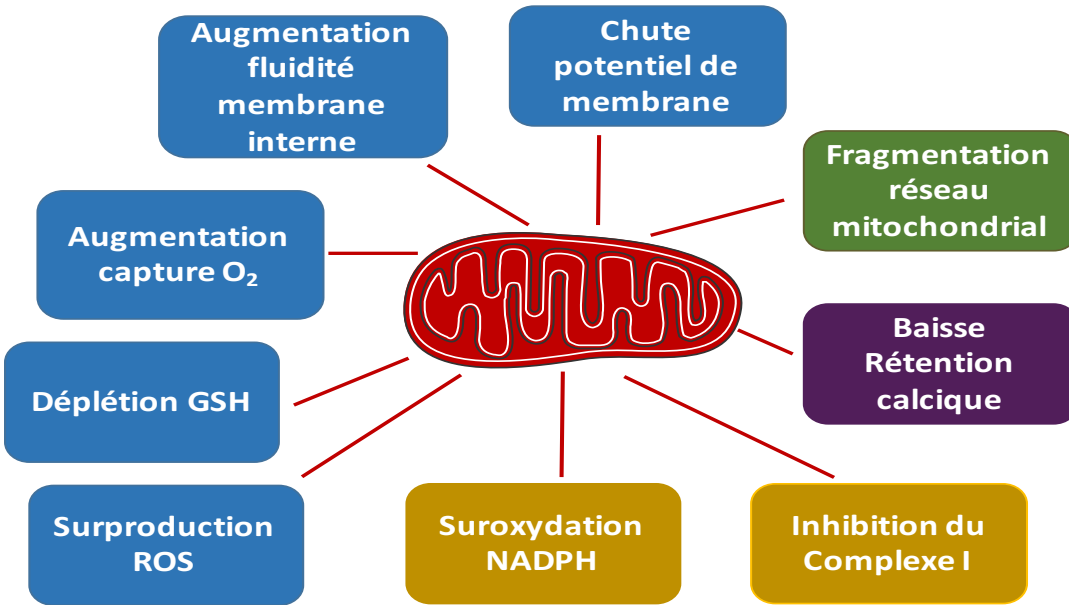


Figure 13. Anomalies mitochondriales dans la FK

5 Métabolisme intestinal des lipides

L'appareil digestif est composé du tube digestif et des organes digestifs accessoires (glandes salivaires, pancréas et foie). Le tube digestif mesure en moyenne 4,5 m chez l'homme. Il est constitué de divers segments : l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon), le gros intestin ou colon (caecum, appendice, colon ascendant, colon transverse, colon descendant, colon sigmoïde et rectum) et l'anus (Chassaing, 2011). La bouche en constitue la porte d'entrée et on y inclut également le pharynx.

5.1 Intestin grêle

5.1.1 Caractéristiques anatomiques

L'intestin grêle est un tube creux d'environ 5m de longueur, intercalé entre l'estomac et le colon. Il s'étend du sphincter pylorique à la valvule iléo-caecale. Il comprend trois portions que sont le duodénum, le jéjunum et l'iléon.

Duodénum : Il fait immédiatement suite à l'estomac et s'étend du pylore à l'angle duodénojéjunal de Treitz. Il se positionne tout autour du pancréas. C'est une portion courte qui constitue le lieu de déversement du chyme, de la bile acheminée par le canal cholédoque et des sécrétions pancréatiques par le canal de Wirsung.

Jéjunum : C'est la partie centrale du grêle qui se situe entre le duodénum et l'iléon. C'est le site par excellence de l'absorption. Sa longueur est estimée à environ 2/5^e de l'intestin grêle.

Iléon : C'est la dernière portion. Elle représente les 3/5^e distaux du grêle et se termine au niveau de la valvule iléo-caecale ou valvule de Bauhin qui contient un sphincter (Marcil, Peretti, Delvin, & Levy, 2004; St-Martin Crites, 2015).

5.1.2 Structure histologique

Muqueuse : Elle est caractérisée par une surface d'échange importante qui vise à maximiser l'absorption des nutriments. La disponibilité de cette surface d'échange estimée à 350m² est rendue possible par la longueur de l'intestin grêle et la présence de diverses structures. Il s'agit des valvules conniventes surtout présentes au niveau du jéjunum et qui sont recouvertes de villosités intestinales de longueur maximale au niveau du duodénum et du jéjunum proximal. Les villosités intestinales se composent à leur tour de microvillosités. Au centre de chaque villosité intestinale se trouve un axe conjonctif lâche qui abrite des capillaires sanguins situés au contact de la lame basale de l'épithélium. A ce niveau s'insèrent également les muscles de Brücke formés par des faisceaux de fibres musculaires lisses. Le canal de drainage lymphatique borgne de la villosité est appelé le chylifère. C'est la porte d'entrée de la majeure partie des lipides absorbés (Marcil et al., 2004; St-Martin Crites, 2015).

L'épithélium de revêtement de la muqueuse intestinale est une monocouche renfermant divers types cellulaires : les entérocytes, les cellules caliciformes et des cellules endocrines. La cohésion de ces cellules est assurée par plusieurs types de jonctions intercellulaires : les jonctions serrées qui jouent un rôle majeur dans la perméabilité membranaire sont situées au pôle apical des cellules épithéliales. Il s'agit de complexes multi-protéiques composés de la claudine, de l'occludine, des Zonula occludens (ZO1 et ZO2) et de l'actine du cytosquelette (Chassaing, 2011). Les jonctions adhérentes composées de protéines de la famille des cadhérines se situent sous les jonctions serrées et participent au maintien de la polarisation, à la différenciation cellulaire et à la communication intercellulaire. Les desmosomes constituent un

complexe fonctionnel qui résulte des interactions entre la desmogléine, la desmocolline, la desmoplakine et les filaments de kératine du cytosquelette. Les desmosomes sont perméables au LPS (Chassaing, 2011).

Les entérocytes : Ce sont des cellules prismatiques qui représentent 80% des cellules intestinales. Elles prennent naissance dans les cryptes et migrent vers le sommet de la villosité en se différenciant. Leur plateau strié apical est fait de microvillosités et contient de nombreuses enzymes telles que les peptidases, les disaccharidases et les phosphatases alcalines. Ces microvillosités correspondent à de fins prolongements cytoplasmiques, de disposition parallèle, contenant de la myosine et des filaments d'actine. La villine et la fimbrine assurent la stabilité architecturale de ces filaments. Les entérocytes disposent latéralement de systèmes de jonction permettant d'assurer l'étanchéité de l'espace intercellulaire. Les entérocytes expriment les gènes codant pour les protéines impliquées dans les mécanismes de transport et d'absorption.

Les cellules caliciformes : Elles élaborent le mucus et stockent les grains de sécrétion au pôle apical.

L'épithélium intestinal se prolonge dans le chorion et forme les glandes de Lieberkühn qui s'ouvrent à la base des villosités. Elles jouent un rôle essentiel dans le renouvellement épithélial à cause de la présence de cellules souches pluripotentes. Ces glandes se composent d'entérocytes, de cellules caliciformes, de cellules entéro-chromaffines et de cellules de Paneth. Ces dernières sont localisées dans la partie basale des glandes de Lieberkühn. Leur cytoplasme basophile est riche en lysosomes.

La muqueuse de l'iléon se caractérise par l'abondance de cellules caliciformes, de glandes de Lieberkühn et par la présence de formations lymphoïdes appelées plaques de Peyer (St-Martin Crites, 2015).

Sous-muqueuse : Elle se compose de tissu conjonctif, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de fibres élastiques et d'un réseau neuronal appelé plexus sous-muqueux. Sa portion duodénale abrite les cellules de Brunner. Il s'agit de glandes tubulo-acineuses dont les canaux excréteurs traversent le *muscularis mucosae* avant de s'aboucher dans la lumière intestinale. Elle sécrète une mucine alcaline destinée à protéger le duodénum contre l'acidité gastrique et à optimiser l'action des enzymes pancréatiques en augmentant de pH du contenu intestinal (St-Martin Crites, 2015).

Musculeuse : Elle joue un rôle majeur dans le péristaltisme intestinal et ceci est liée à sa structure particulière faite de cellules musculaires lisses longitudinales et circulaires (Marcil et al., 2004).

Séreuse : C'est la couche la plus externe. Elle est mince, constituée de tissu conjonctif et de cellules de la couche viscérale du péritoine. Elle est fixée au mésentère et assure la protection de l'intestin (St-Martin Crites, 2015).

5.1.3 Physiologie

L'intestin grêle est doté de fonctionnalités multiples impliquées dans le processus de digestion et d'assimilation des aliments. Il conditionne la biodisponibilité des nutriments (Petit, Niot, Poirier, & Besnard, 2007).

Fonction mécanique : Elle assure la progression du bol alimentaire grâce aux mouvements péristaltiques.

Fonction de digestion : elle résulte de l'action intra luminale des sécrétions épithéliales, des sécrétions glandulaires de la muqueuse, des sécrétions hépatiques et pancréatiques.

Fonction d'absorption : elle consiste au passage trans-intestinal puis à la diffusion dans l'organisme des produits de la digestion. L'absorption intestinale n'est pas uniforme. En effet, certaines portions absorbent les nutriments plus efficacement que d'autres. Ainsi, les lipides, les protéines et les hydrates de carbone sont surtout absorbés au niveau du duodénum et du jéjunum. Les sels biliaires et la vitamine B12 au niveau de l'iléon tandis que le fer et le calcium dans le duodénum.

Fonction endocrine : elle est assurée par le système endocrine responsable de la sécrétion des hormones peptidiques et des neurotransmetteurs

Fonction de défense immunitaire : Elle s'exerce vis à vis d'antigènes contenus dans les aliments ou issus de la dégradation de microorganismes. Il existe cependant un système de régulation qui prévient l'élimination des bactéries « inoffensives », commensales qui composent la flore intestinale. Ces bactéries commensales s'impliquent de diverses manières dans le contrôle de l'inflammation et dans la régulation de la réponse immune afin de préserver l'intégrité de la barrière épithéliale. Les peptides antimicrobiens (défensines, les cathélicidines et les lectines de types C) peuvent être sécrétés par les entérocytes et les cellules caliciformes mais les cellules de Paneth sont les plus spécialisées (Chassaing, 2011). Le mucus sécrété par les cellules

caliciformes est un gel viscoélastique constitué d'eau (95%) et de mucines (5%) qui tapisse la face luminale de l'épithélium intestinal. Sa couche interne constitue une barrière physique qui sert à piéger les bactéries pathogènes liées aux IgA sécrétoires ainsi que leur toxine, les empêchant ainsi de traverser la barrière épithéliale. Sa couche externe qui est le siège d'un renouvellement permanent a une fonction de lubrification (Chassaing, 2011).

5.2 Gros intestin ou colon

5.2.1 Caractéristiques anatomiques

Le colon fait suite à l'intestin grêle. Sa longueur est d'environ 1,5m et son calibre plus important que celui du grêle. Il s'étend de la valvule iléo-caecale à l'anus. Il comporte également plusieurs segments successifs que sont : le caecum, le colon ascendant, le colon transverse, le colon descendant, le sigmoïde rectum et l'anus.

5.2.2 Structure histologique

Tous les segments coliques ont la même structure histologique. La surface interne du colon est lisse, dépourvue de villosités.

Muqueuse : l'épithélium de la muqueuse colique est riche en cellules à mucus (cellules caliciformes). Elle contient aussi des colonocytes qui régulent les niveaux d'eau et d'électrolytes afin d'optimiser la consistance des matières fécales. Les jonctions serrées à ce niveau sont beaucoup plus étanches que dans le grêle prévenant ainsi la diffusion d'ions et la sortie d'eau. Le chorion contient des glandes de Lieberkhün essentiellement composée de cellules caliciformes dont le mucus facilite la progression du contenu intestinal.

Musculeuse : Elle est constituée d'une couche circulaire interne et fine et d'une couche longitudinale externe d'épaisseur variable. La région anale comporte un sphincter interne et un sphincter externe (Marcil et al., 2004).

5.2.3 Physiologie

Les rôles majeurs du colon sont l'hydratation des selles et la fermentation bactérienne (Marcil et al., 2004).

Fonction de motricité : le brassage du contenu du colon se fait par l'entremise de mouvements de contraction segmentaire. Sa propulsion vers le rectum fait intervenir par contre des mouvements longitudinaux.

Fonction d'absorption : la capacité d'absorption du colon est estimée à 300-400ml d'eau /jour. L'absorption du chlore et du sodium se fait par le biais d'un transport actif. Les colonocytes absorbent très peu le glucose et les acides aminés. En cas de déféctuosité de l'absorption des graisses au niveau du grêle, les membranes lumnales du colon peuvent faire office de surface d'absorption

Fonction de sécrétion : Elle est assurée par les cellules caliciformes.

Fermentation bactérienne : les microorganismes de la flore bactérienne induisent une fermentation des aliments complexes non digérés. La synthèse des vitamines B1, B2, B12 et K résulte de cette activité bactérienne. En outre, les acides gras à chaînes courtes (*Short Chain Fatty Acid* ou SCFA) (acétate, propionate et butyrate) sont métabolisés par les bactéries intestinales (Wu et al., 2016).

5.3 Métabolisme des lipides

Les lipides alimentaires sont constitués majoritairement de triglycérides (TG) composés essentiellement d'AG à longues chaînes, ainsi que de phospholipides (PL), et de cholestérol (Kalivianakis et al., 1999; Peretti et al., 2005). Le métabolisme intestinal des lipides alimentaires se déroule en plusieurs étapes.

5.3.1 Digestion

Elle comprend deux processus intriqués que sont la lipolyse (hydrolyse des lipides) et la dispersion des produits de la lipolyse par les acides biliaires. Les TG apportés par l'alimentation subissent une première hydrolyse dans la lumière de l'estomac, sous l'action de la lipase gastrique. Cette enzyme, dont l'action est optimale à un pH oscillant entre 3 et 6, est responsable de 70 à 75% de l'hydrolyse des TG et des diacylglycérols (DG). Elle sectionne les liens en position sn-1 et sn-3 des acides gras à longue chaîne (*Long Chain Fatty Acid* ou LCFA) et en position sn-2 pour les acides gras à chaînes moyennes (*medium chain fatty acid* ou MCFA). Son action sur les LCFA génère des AG libres (AGL) et des monoacylglycérols (MG) (AG en

position sn-2) qui constituent la forme majeure d'absorption au niveau de l'intestin (Marcil et al., 2004).

L'acidité du chyme gastrique va stimuler la sécrétion de deux hormones duodénales que sont la sécrétine et la cholécystokinine. La sécrétine va déclencher une sécrétion aqueuse bicarbonatée du canal pancréatique visant à neutraliser l'acidité gastrique et à optimiser l'action des enzymes pancréatiques. La cholécystokinine va quant à elle entraîner la libération d'enzymes protéolytiques, d'une amylase et d'une lipase à partir du pancréas et provoquer la contraction de la vésicule biliaire (Wier & Kuhn, 2011). Dans le duodénum, les sels biliaires procèdent à l'émulsification des grosses gouttelettes de TG en petites particules. Suite à l'hydrolyse des TG, les MG et les AGL s'associent aux sels biliaires pour former les micelles. La micellisation confère des propriétés de solubilité aux produits de la digestion.

La PLA₂ pancréatique hydrolyse les PL notamment les phosphatidylcholines (PC) en lyso-PC et le cholestérol ester (CE) qui équivaut à 10-15% du cholestérol alimentaire est hydrolysé par la cholestérol estérase pancréatique en cholestérol libre (CL) (Marcil et al., 2004).

5.3.2 Absorption

La dissociation des lipides et des sels biliaires, condition indispensable à leur absorption intestinale, est assurée par le microenvironnement acide présent à la surface de la bordure en brosse des entérocytes. Ce microenvironnement est une zone aqueuse qui se renouvelle lentement à cause de la présence de glycoprotéines constitutives du mucus et du glycocalyx. En outre, un gradient de pH est généré à ce niveau par les pompes à protons localisés au pôle apical des entérocytes. La dissociation micellaire survient lorsque que le pH local devient inférieur au pKa des LCFA. Ces derniers se protonnent et leur captation devient plus aisée (Petit et al., 2007). Les MG, les lyso-PL et le cholestérol libre, franchissent la membrane microvillositaire tandis que les acides biliaires sont absorbés en grande majorité au niveau de la portion terminale de l'iléon. Le passage de la membrane plasmique peut se faire par diffusion simple sans recours énergétique et selon le gradient de concentration. Cette option serait l'apanage de petites quantités d'AG à chaînes courtes et moyennes qui du fait de leur hydrosolubilité relative traversent rapidement la barrière intestinale et empruntent la veine porte pour atteindre le foie (Petit et al., 2007). D'autres fois, l'absorption se fait par le biais d'un transport actif impliquant des transporteurs membranaires. Il s'agit notamment du *Fatty Acid Binding Protein* (FABP) de

la membrane plasmique qui a une grande affinité pour les LCFA, les lyso-PC, les MG et le cholestérol. Cette protéine de 43kDa est localisée dans le foie, le cœur, le tissu adipeux, le placenta et l'intestin grêle au niveau des membranes apicale et basolatérale (Petit et al., 2007). Les autres transporteurs sont le *Fatty Acid Transport Protein* (FATP) et le *Fatty Acid Transporter* (FAT). Le récepteur éboueur de classe B type I SR-B1 est un transporteur spécifique du cholestérol (Bogardus, 1996; Trotter, Ho, & Storch, 1996).

La traversée du milieu cytosolique aqueux qui sépare la bordure en brosse du RE implique l'intervention de transporteurs : les FABP cytosoliques dont l'une intestinale (I-FABP) exclusivement exprimée au niveau de l'intestin grêle et l'autre hépatique (L-FABP) qu'on retrouve dans le foie mais également dans l'intestin et les reins (Marcil et al., 2004).

Dans le RE, le MG, le lyso-PC et le cholestérol libre sont réestérifiés respectivement, en TG, en PC et en CE. Le processus de réestérification est un processus enzymatique. Ainsi, la réestérification des MG en TG peut être catalysée d'une part, par la monoacylglycérol acyltransférase puis la diacylglycérol acyltransférase et d'autre part, par la glycérophosphate acyltransférase puis la phosphatidate phosphohydrolase. La première voie est privilégiée durant la période postprandiale et la seconde dans des conditions particulières comme le jeûne. Le complexe multienzymatique de la première voie est retrouvé à la face externe du RE lisse tandis que celui de la deuxième voie au niveau du RE rugueux. La réestérification des lyso-PC fait intervenir la lyso-PC acyltransférase tandis que celle du cholestérol libre implique l'action de la cholestérol estérase et de l'Acyl-CoA cholestérol Acyl transférase (ACAT). ACAT1 a une distribution ubiquitaire tandis que ACAT2 est essentiellement présente dans le foie et le grêle.

5.3.3 Formation des lipoprotéines

L'intestin grêle est capable de sécréter divers types de lipoprotéines servant de « véhicules de transport » aux lipides réestérifiés. Il peut s'agir de chylomicrons (CM), de lipoprotéines de très faible densité (*Very-Low-Density Lipoprotein* ou VLDL), de lipoprotéine de haute densité (*High-Density Lipoprotein* ou HDL) ou encore de lipoprotéine de faible densité (*low-density lipoprotein* ou LDL). Cependant, les CMs sont les lipoprotéines par excellence des entérocytes. Ils sont exclusivement sécrétés par ces derniers et constituent de ce fait, le principal véhicule des graisses alimentaires et des vitamines liposolubles. En effet, l'intestin produit les CM en

période postprandiale tandis que la production des VLDL a lieu en période inter-prandiale (Petit et al., 2007).

5.3.3.1 Chylomicrons

Les CMs sont des lipoprotéines dont le diamètre oscille entre 800 et 5000 Å et dont la densité est estimée à 0,93 g/ml. Ils se composent essentiellement de TG alimentaires (85-88%), de PL (8%), de cholestérol (5%), protéines (2%) et d'apolipoprotéines (Apo B48, A-I, A-II, A-IV, C-I et C-III). Dans la circulation sanguine, ils peuvent également revêtir les apolipoprotéines C-II, et E. L'Apo B-48, spécifique du CM, est nécessaire à son assemblage et à sa sécrétion. L'Apo-B est une glycoprotéine synthétisée dans le RE rugueux et qui existe sous deux formes : Chez l'humain, l'Apo-B100, protéine de 4536 acides aminés est essentiellement produite par le foie tandis que la synthèse de l'Apo-B48 est uniquement intestinale. L'Apo B-48 est formée de 2152 résidus amino terminaux de l'Apo B-100 et résulte d'une modification post transcriptionnelle de l'ARNm qui a lieu dans l'intestin (editing de l'Apo B). Le transfert des TG, des PL et du CE, du RE lisse vers l'Apo B-48 implique l'action d'une protéine hétérodimère qu'est le *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP). Cette protéine est indispensable à l'assemblage et à la sécrétion des lipoprotéines riches en TG c'est à dire les CM et les VLDL. En effet, elle assure la lipodation de l'Apo B-48 au cours de sa synthèse et prévient sa dégradation par le protéasome. Les propriétés de transfert lipidique du MTP proviennent de sa première composante, une sous unité de 97 kDa. Sa seconde composante est une enzyme multifonctionnelle de 58kDa la *Protein Disulfide Isomerase*. Elle est indispensable à la formation du complexe soluble actif. Au terme du processus de lipodation, d'autres lipides et apolipoprotéines viennent étoffer la composition des CM avant leur transfert vers l'appareil de Golgi. La protéine Sar 1b joue un rôle critique dans ce transfert. Dans l'appareil de Golgi, les particules de PL subissent une modification dans leur composition en PL et une finalisation de la glycosylation des apolipoprotéines. Les CM acquièrent leur maturité puis sont transportés dans le cytosol par le biais de vésicules dérivées de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane basolatérale. Leur exocytose dans les espaces intercellulaires de l'épithélium intestinal précède leur déversement dans la circulation sanguine *via* le canal chylifère et la lymphe. Dans le sang, l'hydrolyse des TG par la lipoprotéine lipase libère des AG qui peuvent constituer une source d'énergie pour les organes périphériques ou être stockés dans le tissu adipeux (Marcil et al., 2004) (figure 11).

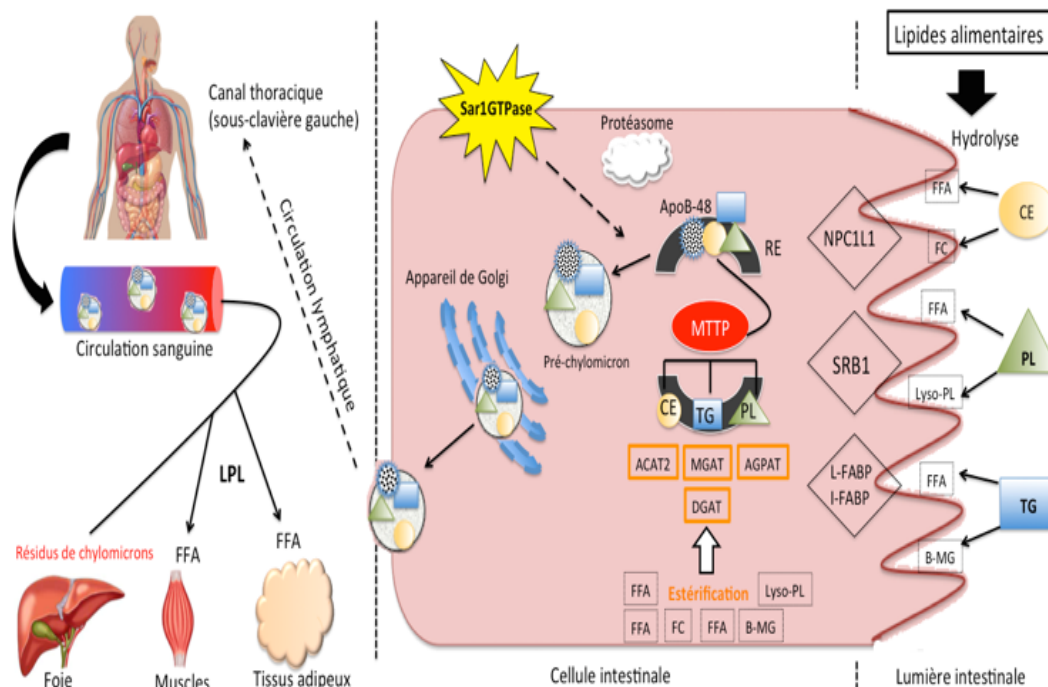


Figure 14. Biosynthèse des chylomicrons

Les chylomicrons sont synthétisés à partir du CE, des TG et des PL issus de la ré-estérification des acides gras libres, du cholestérol libre et des lyso-phospholipides. Le MTTP est indispensable à la lipidation de l'Apo B-48 dans le réticulum endoplasmique. Les pré-chylomicrons formés atteignent leur maturation dans l'appareil de Golgi puis sont sécrétés dans la circulation sanguine *via* le canal chylifère et la lymphe. FFA=*free fatty acid*, Apo-B-48=apolipoprotéine B-48, RE= réticulum endoplasmique, MTTP= *microsomal triglyceride transfer protein*, CE= *cholesterol ester*, TG= *triglycerides*, PL= phospholipides, ACAT2= *acetyl-CoA acetyltransferase 2*, MGAT= *monoacylglycerol acyltransferase*, AGPAT= *1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferases*, DGAT= *diglyceride acyltransferase*, FC= *free cholesterol*, Lyso-PL= *lyso-phospholipides*, B-MG= *beta- monoglyceride*, NPC1L1= *Niemann-Pick C1-like 1*, SRB1= *scavenger receptor class B type 1*, L-FABP= *liver-fatty acid binding protein*, I-FABP= *intestinal fatty acid binding protein*.

(adapté de Levy, 2015) (Emile Levy, 2015).

5.3.3.2 VLDL

Ces lipoprotéines peuvent être synthétisées par l'intestin mais leur site de production par excellence est hépatique. Leur diamètre est estimé à 500 Å et leur densité < 1,006 g/ml. Elles contiennent principalement de TG endogènes. Les apolipoprotéines qui entrent dans sa

composition sont Apo B-100, C-I, C-II et C-III et E. Cette composition est néanmoins soumise à de nombreuses variations. L'Apo B-100 est l'apolipoprotéine indispensable à l'assemblage et à l'intégrité structurelle du VLDL (Gagné & Gaudet, 2007).

5.3.3.3 IDL

Elles sont le produit de l'hydrolyse des VLDL par les lipases. Leur taille et leur densité sont intermédiaires de celles des VLDL et des LDL. Leur taille est estimée à 300 Å et leur densité entre 1,000- 1,019 g/ml. Les IDL se composent essentiellement de cholestérol et de TG. Les apolipoprotéines présentes sont les Apo B-100, C et E (Gagné & Gaudet, 2007).

5.3.3.4 LDL

Les particules de VLDL soumises à l'action des lipases, s'appauvrissent progressivement en TG et s'enrichissent en CE. Les LDL sont les dernières lipoprotéines de cette cascade à exprimer l'Apo B-100. Leur taille est d'environ 200 Å et leur densité de 1,019-1,063 g/ml. Leur constituant majeur est le cholestérol. Les caractéristiques des LDL sont sujets à des variations notamment en ce qui concerne la taille, la densité et les propriétés (Gagné & Gaudet, 2007).

5.3.3.5 HDL

Il existe trois types de HDL : Il en existe trois types : les HDL₁ ou HDL naissants ou encore HDL immatures, les HDL₂ et les HDL₃. Les HDL naissants, sécrétés par le foie et l'intestin, sont issues des résidus d'hydrolyse des CM et des VLDL. Leur diamètre est de 50 Å, leur densité oscille entre 1,063-1,210g/ml. Ils sont constitués essentiellement de cholestérol et d'Apo A-I. On y trouve également les Apo A-II, C, E. Diverses enzymes sont impliquées dans leur métabolisme. Il s'agit notamment de la lécithine-cholestérol-acyltransférase, de la lipase hépatique, de la protéine de transfert des esters de cholestérol et de la lipase endothéliale. Le HDL₃ issus de ce métabolisme reçoivent des PL, du cholestérol et des apolipoprotéines provenant de la lipolyse des CM et des VLDL et se transforment en HDL₂ (Gagné & Gaudet, 2007).

5.4 Modulation du métabolisme intestinal des lipides dans la FK

La stéatorrhée est un signe pathognomonique de la FK résultant de la malabsorption intestinale des lipides. Plusieurs études ont été entreprises afin d'identifier ses caractéristiques et élucider les facteurs contribuant à sa genèse. Ainsi, diverses anomalies ont-elles été rapportées au cours de la phase intraluminaire de digestion mais également au cours de la phase entérocytaire (figure 12).

5.4.1 Phase endoluminaire

Dans le contexte de la FK le processus de digestion des lipides présente des irrégularités pouvant compromettre l'absorption intestinale

5.4.1.1 Anomalies de la sécrétion bicarbonatée

La défectuosité du canal CFTR via l'altération des échanges chlore / bicarbonate à travers la membrane apicale des cellules épithéliales exocrines du pancréas, conduit à l'obstruction du canal pancréatique et à des anomalies de la sécrétion bicarbonatée (Paul M. Quinton, 2008; Tang, Fatehi, & Linsdell, 2009). Ceci a pour conséquence une entrée de l'acidité gastrique dans le duodénum et même dans le jéjunum dont le pH est inférieur à 1 - 2 unités des valeurs de contrôle (Weber & Roy, 1984). La baisse du pH induit une précipitation des sels biliaires et une chute de leur concentration duodénale en-dessous du seuil critique de concentration micellaire limitant ainsi l'absorption intestinale (Zentler- Munro, Fitzpatrick, BATTEN, & Northfield, 1984). Cette acidité duodénale altère l'action des enzymes pancréatiques avec un retentissement sur la lipolyse (Belli et al., 1987). Elle compromet également l'extension de la mucine induisant une viscosité et un épaissement altérant la translocation des lipides dans l'intestin (M. A. Garcia, Yang, & Quinton, 2009).

5.4.1.2 Anomalies fonctionnelles des sels biliaires

La perturbation des fonctions biliaires dans la lumière intestinale découle de divers facteurs. La perte fécale massive des sels biliaires est fréquemment incriminée. Elle va aboutir à une réduction considérable du pool biliaire avec limitation de l'émulsification et de la solubilisation, altérant ainsi l'absorption des lipides (O'Brien et al., 1993). Elle induit également une élévation du ratio glycine / taurine compromettant davantage la solubilisation (Belli et al., 1987; Robb,

Davidson, & Kirubakaran, 1985; Weizman, P R Durie, Kopelman, Vesely, & G.G., 1986). Cette excrétion exagérée des sels biliaires serait causée par leur précipitation en milieu acide tel que décrit précédemment mais également par les troubles de leur réabsorption via le cycle entérohépatique. En effet, cette réabsorption serait entravée par des altérations de la muqueuses intestinale, l'épaississement du mucus et la pullulation microbienne dans la lumière intestinale source de déconjugaison et de déshydratation des sels biliaires (Shindo, Machida, Fukumura, Koide, & Yamazaki, 1998). La composition et l'importance du flux biliaire participent également à ces troubles (Kalivianakis et al., 1999; Minich, Vonk, & Verkade, 1997).

5.4.1.3 Insuffisance pancréatique exocrine

La lipase pancréatique est en général retrouvée en quantité suffisante dans la lumière intestinale. Dans la FK, les troubles de la digestion apparaissent en cas de dysfonction sévère du pancréas (Wouthuyzen-Bakker et al., 2011). En effet la fibrose du pancréas exocrine, décrite comme conséquence ultime de l'obstruction canalaire par les sécrétions épaisses et visqueuses, aboutit à un défaut de prolifération des cellules sécrétoires (Cohen et al., 1998; Shalon & Adelson, 1996). La malabsorption intestinale survient lorsque la quantité de lipase pancréatique est inférieure à 10% des valeurs normales (Waters et al., 1988). Il est aussi rapporté une déficience en colipase, en cholestérol estérase, en PLA1 et PLA2 limitant l'hydrolyse des lipides (Peretti et al., 2005).

5.4.1.4 Anomalie du temps de transit gastro-intestinal

Une perturbation de la motilité qui se traduit par un allongement du temps de vidange gastrique et du temps de transit intestinal, a été parfois rapportée dans la FK et contribuerait à réduire l'efficacité de l'hydrolyse des TG par les EPGR (Dalzell et al., 1990; Taylor et al., 1999).

5.4.2 Phase entérocytaire

5.4.2.1 Anomalies de la muqueuse intestinale

Dans le contexte de la FK, les glandes exocrines de l'intestin grêle du fait des troubles hydro-électrolytiques, sécrètent un mucus épais et visqueux aux propriétés physiques défectueuses (Gustafsson et al., 2012; Korotkova & Strandvik, 2000). La muqueuse intestinale présente une

hypertrophie iléale et une atrophie partielle des villosités résultant de l'acidité, de la dénutrition et de l'inflammation (Van Biervliet et al., 2010). Une pullulation bactérienne composée majoritairement de bactéries Gram (-) est mentionnée (Lisowska, Wójtowicz, & Walkowiak, 2009; Norkina, Burnett, & De Lisle, 2004), de même qu'une augmentation de la perméabilité intestinale (R. C. De Lisle, 2014) et une inflammation chronique (R. C. De Lisle, Mueller, & Boyd, 2011; Smyth et al., 2000; Werlin et al., 2010). Ces différents éléments entravent l'absorption optimale des AG.

5.4.2.2 Anomalies de la formation des chylomicrons

Divers auteurs ont rapporté une anomalie de la formation et de la sécrétion des CM dans le contexte de la FK (Peretti et al., 2005; Werlin et al., 2010). Ce défaut étant associé à une réduction significative de l'estérification des lipides et de leur sécrétion, une baisse de l'incorporation de l'acide palmitique dans les TG, PL et CE, une diminution de la synthèse de l'Apo B-48 et de l'Apo AI tandis que l'activité du microsomal triglyceride transfer protein (MTP) est conservé. Une interaction probable entre le fonctionnement de la protéine CFTR et la voie d'élaboration et de dégradation de l'Apo B déterminante à l'assemblage des lipoprotéines a été suggérée par certains auteurs. Il en est de même pour le facteur de ribosylation de l'ADP qui a un rôle central dans l'assemblage des VLDL (Peretti et al., 2005). Les acteurs intervenant dans ce processus de formation des lipoprotéines sont multiples et la connaissance de chacune de leurs caractéristiques fonctionnelles dans le contexte de la FK n'est pas encore effective. Cependant, l'implication à différents niveaux de la déficience en AGE dans la persistance de la malabsorption intestinale des AG a fait l'objet de diverses études ayant permis de révéler leur rôle pivot.

5.4.2.3 Déficience en AGE

La déficience en AGE contribue à la malabsorption intestinale des lipides à différents niveaux. Les AG à longues chaînes sont impliqués dans la régulation de plusieurs transporteurs intervenant dans le métabolisme lipidique. Ils majorent l'expression génique de FABP et de CD36 ainsi que l'expression protéique de SRB1, réduisent l'expression protéique de ABCA1 et du flux de cholestérol (Uehara et al., 2002). Ils modulent la synthèse des lipides, la biogenèse des apolipoprotéines ainsi que l'assemblage des lipoprotéines dans les entérocytes (Venglarik,

Bridges, & Frizzell, 1990). Il a ainsi été démontré que le déficit en AGE entraîne des anomalies de la concentration, de la taille et de la composition de lipoprotéines (E. Levy et al., 1989). En effet, l'auteur rapporte une hypocholestérolémie associée à une réduction significative du LDL-C et une réduction modérée du HDL-C dans le plasma. Ceci découlerait probablement de l'interruption de la circulation entérohépatique des acides biliaires et stérols neutres qui aboutirait à une réduction du taux de cholestérol dans le foie avec stimulation de la synthèse des LDL récepteurs majorant la capture des LDL et réduisant ainsi leur concentration plasmatique. La composition des lipoprotéines révèle une teneur réduite en CE tandis que celle des TG est nettement élevée. Ceci conduit à une augmentation de la taille des VLDL, LDL et HDL2. Les HDL3 sont cependant de petites tailles (Chautan et al., 1991; E. Levy et al., 1989). D'autres auteurs mettent en exergue la réduction des taux de ré-estérification des TG dans ce contexte de déficience en AGE et qui sans nul doute affecte la synthèse des lipoprotéines de même que leur sécrétion (Coleman, Wang, & Ganesh Bhat, 1998). Il a été aussi démontré que la déficience en AGE modifie les phases intraluminale et entérocytaire de l'absorption intestinale en modifiant la fluidité et la flexibilité des membranes cellulaires en diminuant le transport des CMs et des TG dans la lymphe, réduisant ainsi leur concentration plasmatique en post prandial (E. Levy et al., 1992). L'élévation de l'AA caractéristique de la déficience en AGE dans la FK entraînerait des troubles de l'absorption intestinale en contribuant à l'inflammation de l'intestin et au relâchement des muscles lisses de la motricité (R.C. De Lisle, Meldi, Flynn, & Kyle, 2008). Les AGE régulent également la synthèse, la polymérisation et le fonctionnement des microtubules. Ainsi, leur déficience pourrait altérer le trafic intracellulaire et le transport des CMs (Anant & Davidson, 2001).

L'ensemble de ces données met en évidence l'existence d'une interaction entre la déficience en AGE, la malabsorption intestinale et les anomalies des lipoprotéines. Cette déficience est certainement un acteur majeur de la physiopathologie des désordres observés dans la FK et les bénéfices cliniques et métaboliques qui suivront sa correction seraient remarquables.

5.4.3 Facteurs extra-intestinaux

5.4.3.1 Anomalies de la synthèse biliaire

Le foie synthétise la bile qui est composée d'électrolytes, de bilirubine, de sels biliaires, de cholestérol et de PL. Dans le foie, la protéine CFTR est exprimée dans les cellules épithéliales et les cholangiocytes du tractus biliaire ainsi que dans l'épithélium de la vésicule biliaire (Taylor & Connolly, 2009). Le défaut de la protéine induit une réduction et un épaississement du flux biliaire puis une obstruction du canal biliaire (C. R. Martin et al., 2012). Celle-ci expose les hépatocytes à de fortes concentrations potentiellement toxiques d'acides biliaires (Taylor & Connolly, 2009). L'épithélium du canal biliaire devient hyperplasique, prolifératif avec une inflammation périphérique et une fibrose, un défaut de fonctionnement de la vésicule biliaire est aussi rapporté ainsi que des calculs vésiculaires (Ratjen & Döring, 2003). L'inflammation serait aussi impliquée dans la réduction du flux biliaire (Miloudi et al., 2012). Le foie est un site par excellence de la synthèse du cholestérol, et les lipoprotéines et surtout le HDL-C contribuent à la constitution du pool hépatique de cholestérol utilisé pour la synthèse des acides biliaires et pour la sécrétion de cholestérol dans la bile. Le CE constituant le substrat par excellence (E. Levy et al., 1989). Les VLDL sont également un moyen d'exportation du cholestérol hépatique. La déficience en AGE associée à l'hypocholestérolémie, à la baisse de la concentration plasmatique des lipoprotéines ainsi qu'à leur faible teneur en CE pourrait moduler la synthèse de la bile. Cette déficience a aussi été associée à des anomalies de l'excrétion biliaire en taurocholate et à une teneur réduite des AGE dans les phosphatidylcholines biliaires essentielles à la formation des micelles (Lepage et al., 1996; Peretti et al., 2005). La sécrétion des phosphatidylcholines est aussi réduite dans ce contexte de déficience en AGE et entraînerait une réduction de l'assemblage et de la sécrétion des CMs. En effet, il a été démontré que les phospholipides des CMs sont majoritairement d'origine biliaire et que la phosphatidylcholine augmenterait la sécrétion de l'Apo B contenu dans les lipoprotéines (Minich et al., 1997). La nature des sels biliaires détermine leur capacité à induire une solubilisation optimale ou non. Ainsi les acides biliaires conjugués à la taurine sont plus efficaces à demeurer dans une solution micellaire que ceux conjugués à la glycine qu'on observe dans le contexte de la FK du fait de la perte fécale excessive de la taurine (Belli et al., 1987; Wouthuyzen-Bakker et al., 2011). Hormis l'élévation du ratio glycine / taurine on note une élévation de la concentration en sels biliaires

hydroxylés. Ces derniers produisent des acides biliaires hydrophobes dont l'élévation de la concentration conduit à une hyperbilirubinémie (Taylor & Connolly, 2009). Une anomalie de la répartition des acides biliaires avec une augmentation du pourcentage d'acide cholique et une baisse des acides déoxycholique et chenodéoxycholique dont l'acide ursodéoxycholique reconnu pour ses importantes propriétés hépatoprotectrices a été signifiée (Taylor & Connolly, 2009). Ces anomalies de la synthèse biliaire retentiraient sur l'absorption intestinale. Cependant certains auteurs rapportent une absence de corrélation entre le degré d'excrétion biliaire et le degré de malabsorption des lipides (O'Brien et al., 1993).

5.4.3.2 Dysfonction de la lipase hépatique

La lipase hépatique est une enzyme lipolytique qui a la capacité d'agir comme une triglycéridase et une phospholipase. Son action cible les lipoprotéines riches en TG (VLDL, IDL, LDL, résidus de CMs) et les HDL. Elle intervient dans la formation des pré- β HDL qui sont des accepteurs privilégiés du cholestérol cellulaire et est impliquée dans la captation hépatique du cholestérol, des HDL et des résidus de CMs. La baisse sévère de son activité a été rapportée dans les cas de FK associé à une déficience en AGE et ceci conduirait à une baisse de la conversion de HDL2 en HDL3. Ce défaut d'activité expliquerait également la haute teneur en TG retrouvée dans les lipoprotéines des patients de FK (E. Levy et al., 1989).

5.4.3.3 Déséquilibre en AGPI

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la déficience en AGE telle que rapportée dans la FK et associant une hausse de l'AA à une baisse de LA et du DHA. Le foie est un site de lipogénèse capable de transformer LA en AA et certains auteurs expliquent la baisse de LA par une augmentation de sa conversion en AA et ce par le biais de l'intensification de l'activité des $\Delta 5$ et $\Delta 6$ désaturases dans la voie des n-6 mais également dans celle des n-3 aboutissant à une élévation de EPA (4fois la normale) (Njoroge et al., 2012). La réduction de la conversion de AA en DPA et de EPA en DHA serait due à une anomalie de la deuxième élongation et expliquerait également le taux élevé de AA et le taux relativement bas du DHA dans la FK (Andersson et al., 2008).

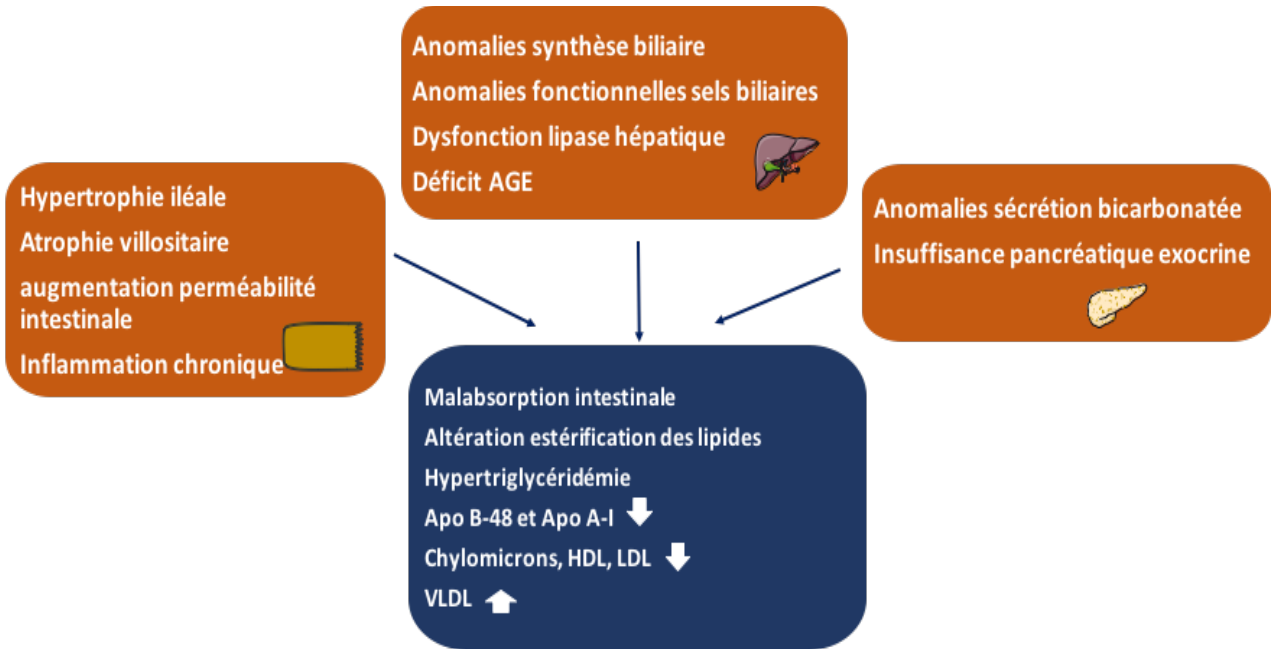


Figure 15. Facteurs modulant le métabolisme intestinal des lipides dans la FK

Objectifs de la recherche

Le déficit en AGE est bien connu dans la FK et ses caractéristiques sont en faveur du profil inflammatoire et oxydatif rapporté dans cette pathologie. Son étiologie n'est pas clairement définie mais les troubles du métabolisme des lipides, incluant la malabsorption intestinale, en constituent de potentielles composantes. Le caractère réfractaire de la stéatorrhée expose continuellement les patients à la survenue de la dénutrition et aux déficits énergétique et vitaminiques avec un risque vital à long terme. Si la malabsorption intestinale peut s'expliquer aisément par l'existence concomitante d'altérations pancréatiques et hépatobiliaires, l'incapacité à la corriger totalement par le biais de la prise en charge nutritionnelle et enzymatique demeure une préoccupation (Mouterde, 2007). De même, le rétablissement de l'équilibre en AGE, la réduction des marqueurs du SOx et la correction des déficits vitaminiques constituent un défi (Back et al., 2004; S. H. Huang et al., 2006; Lisa G Wood, Dominic A Fitzgerald, Alexander K Lee, & Manohar L Garg, 2003). Le devenir intestinal des lipides dans le contexte de la FK a fait l'objet d'un nombre réduit d'études (E. Levy et al., 1989; Peretti et al., 2006) ayant révélé entre autres anomalies, des troubles de la synthèse et de la sécrétion des lipoprotéines et plus particulièrement des CM. Les fonctions et les caractéristiques de la mitochondrie n'avaient cependant pas été explorées. Le rôle évident du SOx tel que démontré à ce jour, la difficulté à le juguler avec les antioxydants habituels, de même que son association concomitante au déséquilibre en AGE imposent des investigations plus poussées de ce processus en vue d'améliorer la compréhension des troubles lipidiques. Dans ce contexte, l'exploration de la mitochondrie devient une étape indispensable étant donné son importance dans le maintien de l'homéostasie redox, sa participation au catabolisme de AG par la β -oxydation, et son essentialité dans le fonctionnement cellulaire. Des dysfonctions de la mitochondrie ont été décrites dans les voies respiratoires de la FK (Fabrice Antigny et al., 2009), mais ses caractéristiques dans l'intestin, organe clé du métabolisme lipidique, ne sont pas connus. Son dysfonctionnement dans cet organe pourrait affecter le devenir des lipides.

L'objectif principal de cette étude est d'améliorer la compréhension du lien entre le CFTR, le SO_x, l'inflammation, le dysfonctionnement mitochondrial et le métabolisme intestinal des lipides. Ceci sur un modèle de cellules épithéliales intestinales Caco 2/15 totalement dépourvues de *CFTR*, mais aussi privées d'un environnement susceptible d'interférer avec l'identification du rôle spécifique du CFTR.

Les objectifs spécifiques que nous nous sommes assignés en vue d'atteindre cet objectif principal sont :

1. Démontrer la présence du SO_x et de l'inflammation dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2/15 dépourvues de *CFTR* tout en élucidant les mécanismes sous-jacents;
2. Évaluer les fonctions mitochondriales et rechercher l'impact de pro-oxydants et d'antioxydants ;
3. Rechercher les modulations du métabolisme entérocytaire des lipides ainsi que les effets de l'usage des antioxydants usuels.

Résultats

Article 1

Forum Review Article

**CYSTIC FIBROSIS-RELATED OXIDATIVE STRESS AND INTESTINAL LIPID
DISORDERS**

Marie-Laure Kleme^{1,2} and Emile Levy^{1,2*}

¹Research Centre, CHU Ste-Justine and Department of ²Nutrition, Université de Montréal,
Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada

Running Title: Oxidative stress in CF

Word count: 9219

Number of references: 161

Greyscale illustrations: 3

Keywords: Cystic fibrosis, Oxidative stress, inflammation, fatty acid metabolism, intestine

Address for correspondence:

*Dr. Emile Levy GI-
Nutrition Unit CHU
Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5
Tel.: (514) 345-7783
Fax: (514) 345-4999
E-mail: emile.levy@recherche-ste-Justine.qc.ca

ABSTRACT

Significance: Cystic fibrosis (CF) is the most common lethal genetic disorder in the Caucasian people. It is due to the mutation of *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)* gene located on the long arm of the chromosome 7, which encodes for CFTR protein. The latter, an ATP binding cassette, is a transmembrane chloride channel that is also involved in glutathione transport. As glutathione/glutathione disulfide (GSH/GSSG) constitutes the most important pool of cellular redox systems, CFTR defects could thus disrupt the intracellular redox balance. Resulting multisystemic diseases are essentially characterised by a chronic respiratory failure, a pancreatic insufficiency, an essential fatty acid deficiency (EFAD) and inadequate levels of antioxidant vitamins. **Recent Advances:** The pathophysiology of CF is complex, however several mechanisms are proposed, including oxidative stress (OxS) whose implication is recognized and has been clearly demonstrated in CF airways. **Critical Issues:** Little is known about OxS intrinsic triggers and its own involvement in intestinal lipid disorders. In spite of the regular administration of pancreatic supplements, high-fat high-calorie diets and antioxidant fat-soluble vitamins, there is a persistence of steatorrhea, EFAD and harmful OxS. Intriguingly, several trials with elevated doses of antioxidant vitamins have not yielded significant improvements. **Future Directions:** The main sources and self-maintenance of OxS in CF should be clarified to improve treatment of patients. Therefore, the present review will discuss the potential sources and review the mechanisms of OxS in the intestine, known to develop various complications, and its involvement in intestinal lipid disorders in CF patients.

1 INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is a common genetic disorder with an autosomal recessive inheritance pattern in Caucasians (128). As a highly lethal disease, it is associated with a shortened life expectancy of 40 to 50 years (44). The condition is caused by a mutation in the *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)* gene located on the long arm of chromosome 7 that encodes a transmembrane protein known as CFTR found in the apical pole of exocrine epithelial cells (142). Respiratory symptoms, frequently at the forefront of the clinical picture, are the principal cause of morbi-mortality (23,44,125). However, the onset of digestive disorders dominated by difficult and persistent steatorrhea occurs earlier in the course of the disease (111). This intestinal malabsorption of lipids essentially results from exocrine pancreatic insufficiency, found in 85% of patients (112,143). Nevertheless, other defects related to the formation of chylomicrons, the principal transport vehicles for dietary fat, have been implicated in absorptive abnormalities (121). Without treatment, fat malabsorption leads to malnutrition, failure to thrive, fat soluble vitamin (ADEK) inadequacy and EFAD (40,96). The multisystemic character of CF has led to a number of investigations aimed at identifying CFTR functions. This transmembrane protein is a dependent and multifunctional cyclic adenosine monophosphate (cAMP) low chloride conductance channel (94). CFTR belongs to the ATP-Binding Cassette family and as such intervenes in the transport of a great variety of substrates such as sugars, proteins, metals and medications (153). CFTR interactions with other transmembrane conductance chloride and sodium channels underscores its major role in intra- and extra-cellular hydro-electrolyte balance (153). CFTR is also implicated in the regulation of the transport of bicarbonate ion, nitrate, formate, acetate and GSH (52,114,155). Noteworthy, the GSH/GSSG couple constitutes the most important pool of cellular redox systems (31,47). The implication of OxS in the complex pathophysiology of CF is widely accepted (159). This involvement has been described predominantly in respiratory pathways

in relation to chronic pulmonary infection, inflammation, lipid peroxidation and the intensification of the metabolism (52,62,161). However, little is known about the role of OxS in the intestinal metabolism of CF. In addition, it is important to stress that various antioxidant supplementation studies on CF patients have for the most part led to mixed results that have not allowed any conclusions to be drawn as to whether their efficacy is significant with regard to pulmonary disease and patient quality of life (52).

Essential fatty acid (EFA) imbalance in CF patients has been known for many decades, long before the discovery of the gene involved. It is characterized by a decrease in linoleic acid and docosahexaenoic acid (DHA) and an increase in arachidonic acid (AA) (23,116,143). These changes were for a long time mainly attributed to intestinal malabsorption secondary to exocrine pancreatic insufficiency (143). Over the last few years, other mechanisms have been proposed such as inadequate dietary EFA consumption, an intensification of the β -oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA)s, an increase in the production of pro-inflammatory eicosanoids, a rise in the peroxidation of PUFAs, an impairment of desaturases or hepatic lipase activity and finally, the possibility of an intrinsically defective EFA metabolism in CF epithelial cells (107,116,158). The severity of the CF genotype has been correlated with the importance of these lipid disorders that could contribute to the inflammatory status observed in this pathology (151). A link between OxS and fatty acids (FA)s is known as well. The latter have been described as modulators of reactive oxygen species (ROS) generation at the level of the mitochondria, phagocytic neutrophils and the endoplasmic reticulum (ER) (137). The capacity to increase OxS by reducing antioxidant enzymatic activities has also been reported (137). Some studies on DHA and/or eicosapentaenoic acid supplementation associated with antioxidant vitamin supplementation have succeeded in re-establishing EFA imbalance in *in vitro* (116) and *in vivo* (107) models and humans (161). However, other studies, have proven to be unsuccessful (23). To this day, lipid disorders observed in CF patients remain a concern

and still raise a host of questions. In fact, various studies show that despite the intake of gastro-resistant pancreatic extracts associated with adequate dietary intake, OxS and FA abnormalities persist (108,159). A parallel plasma FA and ROS concentration increase (161) given a rise to speculation about tolerance of the high-fat diet recommended for the nutritional care of patients. These findings reaffirm the need to understand CF OxS mechanism and lipid disorders particularly in the intestine that constitutes the first interface with alimentation.

2 OxS AND INFLAMMATION IN CF

The redox homeostasis results from the balance between the production of pro-oxidants and their effective neutralization by antioxidant defense systems (150). OxS has thus been defined as a disequilibrium of pro- and anti-oxidative balance in favor of the former (63). The pro-oxidants consist of the ROS, reactive nitrogen species and reactive chlorine species. ROS fill a prominent place in this group (150) and are the intermediates generated by oxygen during oxidation reactions (117). They consist of free radicals such as superoxide anions (O_2^-), hydroxyl radicals ($OH\bullet$) and non-radical species such as singlet oxygen (1O_2) and hydrogen peroxide (H_2O_2), which react as precursors of free radicals with a wide range of cellular macromolecules and reactive substances to form strong free radicals (54). Notably, O_2^- is formed directly from oxygen molecules (O_2) by gain of electron and is therefore considered "primary radical". Its source is essentially mitochondrial, but during enzymatic process or catalysis by various metals it generates the so-called "secondary" radicals (117).

The production of ROS, at moderate rates, is a physiological phenomenon for cell survival given its potential in essential protection of hosts from pathogen invasion, apoptosis regulation and transcription factor activation. In contrast, their overproduction leads to pathological effects in view of deleterious oxidative changes in cellular lipids, proteins and DNA, as well as the formation of inflammatory proteins (109).

Overproduction of ROS and especially O_2^- most often results from the excessive stimulation

of NADPH Oxidases (NOX) through inflammation mediators [e.g. Tumor Necrosis Factor α and interleukin (IL)-1 β], mitochondrial respiratory chain and xanthine oxidase (92).

In an infectious context, ROS may be generated in cell membranes of macrophages and neutrophils following the excessive activation of NOX (92). This pathway is also strongly implicated in CF where infection and chronic neutrophilia are major features giving rise to ROS, thereby resulting in cell signaling (29). Xanthine oxidase is also capable of reducing O_2^- from electrons derived from the oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) to NAD^+ using flavine adenine dinucleotide (FAD) (68). Various enzymes (e.g. dehydrogenases, cyclooxygenases-2, lipoxygenases, peroxidases) are implicated in the production of ROS and xenobiotics play a decisive role in the magnitude of this production (83). Thus, the long-term antibiotic treatment proposed in CF patients could be indexed in this context.

The dismutation of O_2^- by mitochondrial Mn-SOD produces H_2O_2 , that, in the absence of degradation, generates $OH\cdot$ via Fenton reactions and / or Haber-Weiss (83). The latter play a major role in the occurrence of OxS-related deleterious changes and in activation of the kinase cascade (45). The integrity of the antioxidant defense system of mitochondria appears as one of the "hubs" of the redox homeostasis. Its defect reported in CF therefore increases the susceptibility of patients to stress and could be an advantageous therapeutic target. H_2O_2 and O_2^- can be generated in the cytosol from peroxisomes but also from the ER via the cytochrome P450 (29). Importantly, ROS production can come from external stimuli such as ionizing radiation, UV radiation, smoking, air pollution (83).

On the other hand, antioxidant defense systems bring together all of the molecules capable of inhibiting the production of ROS, limiting their propagation or provoking their destruction (117). The antioxidant defense systems are divided into 3 groups: enzymes [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GRx)], redox systems [glutaredoxin and thioredoxin, represented by the two redox couples

GSH/GSSG and thioredoxin/ thioredoxin oxidized ($\text{Trx}(\text{SH})_2/\text{Trx-SS}$) respectively, as well as various proteins such as heme oxygenase, quinone reductase, proteins that chelate iron (transferrin and hemosiderin) and copper (ceruloplasmin and albumin)] and antioxidants or scavengers of free radicals (vitamin E, vitamin C, carotenoids, uric acid) (59,79,109).

In CF, malabsorption of fat-soluble vitamins exposes patients to vitamin E deficiency (α and γ -tocopherol), which plays an essential role in protecting PUFA membrane against lipid peroxidation. It interacts with the peroxy radicals to form tocopheryl radical (63). These are taken into account by the vitamin C and ascorbyl generating radicals which will ultimately be neutralized by GSH (123).

The ubiquinone or coenzyme Q10 (CoQ10) is a lipid-soluble antioxidant that could be affected by fat malabsorption. It is a potent inhibitor of lipid peroxidation, which is found in inner mitochondrial membrane and it acts synergistically with vitamin E (63). The deficit of these two major antioxidants increases the vulnerability of lipid membranes, including mitochondrial and lipoproteins of CF in response to ROS adverse actions.

Glutathione deficiency is widely reported in CF because of the involvement of CFTR in its transmembrane transport. Glutathione is the first line of defense against free radicals and its reduced form (GSH or γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) is of the most importance in the control of thiol redox status (15,104). Various of GSH properties are attributed to the prevention of oxidation of the thiol groups (120), the free radical scavenging, metal chelation and the DNA protection (117). GSH serves as a substrate for GPx while CAT converts H_2O_2 into H_2O and GSSG. GSH also prevents oxidation and alkylation of Keap1 residues. In this context, it is worth recalling that if under nonoxidative states, Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) is normally located in the cytosol through its association with Keap1, during OxS cysteine residues within Keap1 are oxidized, dissociating Nrf2 from Keap1, which allows nuclear translocation of Nrf2 where it binds to genes containing antioxidant response element

(15). The mitochondrial GSH preserves the integrity of mitochondrial proteins and lipids while controlling ROS production (103). The couple GSH/GSSG is recognized as the major redox couple acting as redox buffer (109) and its homeostasis disruption raises oxidative susceptibility of CF patients.

Cysteine (Cys) is the precursor of GSH and plays a critical role in the synthesis, structure and protein functions such as the formation of selenoproteins and GPx (19,78). An elevated plasma level of its oxidized form (cystine or CySS) has been associated with the induction of the markers for chronic fibrotic lung diseases including CF (56,126).

Trx(SH)₂/Trx-SS is the main partner of GSH/GSSG in redox regulation. It is highly responsible for the ubiquitous reduction and repair of oxidative damage of protein thiol groups (5). This couple participates in lipid peroxides degradation, reduces peroxiredoxins involved in the reduction of H₂O₂, regenerates the ascorbyl radical and is involved in redox regulation of transcription factors nuclear factor- κ B (NF- κ B) and activator protein-1 (AP-1) (5). Its action, with respect to AP-1, involves the reduction of oxidized forms of redox effector factor 1, which is responsible for the redox regulation of AP-1 and NF- κ B, through the regulation of activation and dissociation of I- κ B. Trx(SH)₂ is regenerated by NADPH under the action of thioredoxin reductase (109).

Pyridine coenzymes (NADH/NAD⁺, NADPH/NADP⁺, FADH₂/FAD) are also involved in cellular redox processes. NADH and FADH₂ deliver electrons to the mitochondrial respiratory chain while NADPH is involved in antioxidant defense by playing a central role in the reduction of GSSG and Trx-SS. The conversion of NADH to NADPH via nicotinamide nucleotide transhydrogenase of the inner mitochondrial membrane is a critical step in the antioxidant role of coenzymes. Under physiological conditions, it maintains mitochondrial NADPH redox homeostasis (29).

Recently, recognition of ROS as secondary messengers in signaling translation could redefine OxS instead as a disturbance of redox control state and redox signaling (31,57,81). This disturbance may be caused by metallic ions. Alternatively, redox-cycling agents may be accompanied with a modification in redox equilibrium. The protective capacity of antioxidants with regard to this disturbance could not be demonstrated at the end of various large-scale human intervention studies (67). GSH/GSSG, Trx(SH)₂/Trx-SS and Cys/CySS couples, as previously described, constitute the three major redox couples (32). There is no redox balance in these couples that could represent control hubs in various redox processes (31,82).

These redox couples are found at variable redox potentials in different cell compartments. The mitochondria possess the lowest redox status as a result of its alkaline pH, followed by the nucleus, cytoplasm, ER and finally extracellular space (39). The presence of the GSH/GSSG couple has been reported in the mitochondria, nucleus, ER and extracellular space. The Trx(SH)₂/Trx-SS couple is present in the nucleus; Trx1 has been located in the cytoplasm and Trx2 in the mitochondria. As for the Cys/CySS couple, it is found in the cytoplasm and extracellular space. Physiological oxidative stimulation can therefore affect a specific couple in a well-determined compartment (67).

The presence of OxS markers is regularly associated with CFTR defects. Various causes have been reported and include the stress of the ER, innate defect in the metabolism of GSH, intestinal fat malabsorption, abnormalities in antioxidant vitamin transport, and inflammation (8,52,119,147,153).

In severe homozygous CF subjects, misfolded proteins are sequestered in the ER and accumulate between the ER and the Golgi apparatus (102). They interact with the calcium- dependent chaperones, thereby causing calcium homeostasis alterations (3). These abnormalities contribute to ER stress installation resulting in the activation of specific

pathways, including the unfolded protein response path that reduces protein synthesis and the transcription of chaperone gene (89). Consequently, the ER-associated degradation becomes dysfunctional and ineffective in eliminating defective proteins by the proteasome system, leading to an overproduction of ROS and apoptosis (89). Additionally, the accumulation of defective CFTR proteins in the ER contributes to endogenous activation of NF- κ B with direct implications on calcium leak and ROS generation (153). The elevation of intracellular calcium is closely associated with phospholipase A2 (PLA2) activation that increases the release of AA from cell membranes, which contributes to the rise in EFA imbalance reported in CF. Indeed, AA serves as a substrate for the lipoxygenase system, conducting to raised ROS generation, lipid peroxidation and eicosanoid synthesis, along with a fall in mitochondrial membrane potential, Adenosine triphosphate (ATP) production and other oxidative damage to mitochondria (21,131,146). In the CF context, mitochondrial ROS overproduction is associated with marked depletion of GSH and redox imbalance (137). The innate defect in GSH metabolism favors constant antioxidant deficit while promoting PUFA oxidative damage in lipid membranes and circulating lipoproteins, which could explain mitochondrial membrane fluidity changes in CF (137).

Evidently, the exaggerated ROS availability via these various mechanisms will activate various signaling pathways involving growth factors, protein kinases and transcription factors (NF- κ B and AP-1) of inflammation, culminating in the induction of target gene of inflammation (92) which is consistent with the excessive production of proinflammatory cytokines and endogenous NF- κ B activation in the absence of bacterial infection in CF. This inflammatory phenomenon was also observed in heterozygous patients with a single allelic CFTR mutation (131).

Whether the activation of transcription factors and their translocation to the nucleus require oxidative signal in the cytoplasm, their DNA link to the gene regulation of oxidative and

inflammatory components requires on the contrary, reduction status inside the nucleus ensured by Trx (SH)₂ and the redox effector factor 1 (1,16).

2.1 Pathophysiology of respiratory dysfunctions

The presence of OxS and inflammation markers in the respiratory pathways of CF patients has been widely reported in the literature. Chronic infections of the respiratory pathways, by various pathogens, such as *Staphylococcus aureus*, *Hemophilus influenzae* and *Pseudomonas aeruginosa*, have for a long time been considered the starting point first for inflammation and OxS in the respiratory pathways (20). Recent studies have, however, highlighted an increase in the level of expression of pro-inflammatory molecules outside any infection, as well as pulmonary neutrophil infiltration in 24-week-old fetuses (153). This finding suggests instead the existence of an intrinsic inflammatory process linked to CFTR mutation and resulting from a constitutive activation of NF- κ B in CF epithelial cells (153). This inflammation of slight intensity is thought to be increased by chronic infections. The increase in the concentration of ceramides in the lungs and trachea of CFTR-deficient mice and CF patients has also been reported even though the exact mechanism by which they trigger inflammation still remains unknown (12). CF inflammation is characterized by neutrophilia, a significant source of IL-8 production (159) and very probably IL-17, for which a link to inflammatory neutrophilia and mucus excess is increasingly suggested (18). Neutrophil migration in the CF bronchial lumen is accompanied by the release of massive quantities of ROS, including O₂⁻, H₂O₂ and OH[•], mainly by activating the NOX system (37). Type II alveolar epithelial cells and bronchial ciliated cells are also capable of producing significant quantities of ROS via two NOX isoforms (DUOX1 and DUOX2) expressed at the apical membrane of these cells (48). In addition, disequilibrium of the redox balance in bronchial epithelial cells is suggested and three potential mechanisms are proposed: a defect in GSH homeostasis (74,132), an impairment of nitrogen monoxide metabolism (60,61) and disequilibrium of the intracellular

production of H₂O₂ because of the Nrf-2 dysfunction (24,128). The respiratory manifestations of CF have been associated with low GSH levels in bronchial epithelial liquid compared with healthy subjects. In the latter, the increase in GSH concentration is thought to be a defense mechanism against oxidative damage induced by inflammatory stimuli (37). However, the origin of this GSH deficit, remains to be elucidated, as it could result from iterative bronchial infections or simple CFTR dysfunction (37). In any event, the absence or malfunction of CFTR, therefore, seems to lead to redox disequilibrium in epithelial cells and extracellular liquids as well as abnormal ROS production (25). On the other hand, mitochondria, excellent ROS producers and targets via the mitochondrial chain, could participate in this state of stress (45). Lipid peroxidation and protein modifications are biological markers of oxidative damage sustained by epithelial cells and extracellular fluids from the respiratory pathways (86,140). In fact, high plasma levels of 8-isoPGF₂ α (produced by the non-enzymatic oxidation of AA) have been reported over the course of respiratory exacerbation periods in CF (160). Markers of protein damage evolve along with the importance of neutrophilia and respiratory dysfunction (77).

2.2 Hepatic and pancreatic pathophysiology

In CF, the role of OxS and inflammation has been described more in respiratory pathways than in hepatic and pancreatic dysfunctions. However, we know that focal biliary cirrhosis, a characteristic lesion found in CF patients, associates inflammation, biliary proliferation and fibrosis (106). As for pancreatic inflammation, it has been described as mild with a small number of neutrophils and macrophages in acinous tissue (106). The role of OxS in the pathophysiology of pancreatitis has been mentioned by certain authors outside the specific context of CF. They suggest an important role for ROS in the development of pancreatic damage as observed in acute or chronic pancreatitis. The accumulation of ROS in the pancreas is believed to result from their production over the course of acute pancreatitis, but

also from a reduction in endogenous antioxidant capacities (51). ROS could also play the role of a second messenger or chemoattractant for inflammatory cells that would contribute to the production of aggravating inflammatory cytokines as well as pancreatitis (124). The severity of pancreatic involvement correlated with oxidative damage is thought to be alleviated by the use of antioxidant (99).

2.3 OxS and intestinal metabolism in CF

2.3.1 Potential origins of OxS in the intestinal CF

Gastro-intestinal epithelial tissue is very proliferative and self-regenerates every 4-5 days (30). The passage of intestinal cells from proliferation to differentiation or apoptosis is accompanied by an increase in the oxidation potential of intracellular GSH/GSSG redox and extracellular Cys/CySS couples (81,135). *In vitro* studies report that the Cys/CySS ratio modulates the proliferative potential of Caco-2/15 cells (6) and, therefore, probably influences their redox status. Located at the interface between the digestive lumen and the body, the intestinal epithelium is subject to oxidative damage induced by luminal-oxidizing agents (7,31). The intestine and pancreas are the two organs with the greatest number of CFTR transcripts after birth (142). The known role of CFTR in GSH transport could therefore suggest this antioxidant's homeostatic abnormalities in CF intestinal epithelial cells (114). Studies report low levels of GSH in the plasma and neutrophils of CF patients, which suggest GSH homeostasis dysregulation (52,147). A number of studies reveal a depletion of mitochondrial GSH caused by a CFTR mutation in the lungs. This depletion can reach 43% in human pulmonary epithelial cells and 85% in CFTR knockout mice (152). Maldigestion and intestinal malabsorption, characteristic of CF, also lead to a considerable reduction in the availability of liposoluble antioxidants such as vitamin E, carotenoids, CoQ10 and FAs in favor of redox disequilibrium (8,73,119). Thus, an innate defect in GSH metabolism coupled with insufficient absorption of liposoluble antioxidants would contribute to a failure in

antioxidant defense and to an exacerbation of OxS (52). This malabsorption state is in part related to an insufficiency of biliary secretion that also participates in intestinal luminal redox balance (10). Resulting malnutrition could in itself be the source of stress because of the hypoalbuminemia with which it is associated. In fact, certain authors report that albumin is thought to be the plasma protein that is the most susceptible to damage from OxS, which is believed to be the potential link among hypoalbuminemia, inflammation and cardiovascular risks (70). ROS from respiratory pathways submitted to chronic inflammation and infection could also infiltrate the intestine of CF patients via the systemic pathway. It has been demonstrated that mitochondrial ROS production is dependent on its internal redox equilibrium (137) and it increases considerably when there is a depletion of GSH in the mitochondrial matrix. The attendant redox disequilibrium means a reduction in the capacity of Gpx to reduce intra-mitochondrial H_2O_2 . A relationship has been established between 50% depletion in GSH in the matrix and an increase in H_2O_2 production (64). Other studies have demonstrated that this depletion of mitochondrial GSH increased the sensitivity of cells to oxidative damage and apoptosis (28,53). Defective CFTR could therefore contribute to redox disequilibrium of the mitochondria in CF exocrine epithelial cells, including intestinal cells. Little is known to date about the redox profile of the mitochondria in the intestine of CF patients. Its characterization and knowledge about its impact on intestinal metabolism could improve the understanding of the intestinal disorders observed in these patients. The degree to which OxS is implicated could be elucidated and therefore lead to an optimization of therapeutic protocols. Recurrent digestive disorders in CF patients could impair intestinal microbiota implicated in intraluminal antioxidant defense (31). Recent studies on microbiota in CF infants have revealed a concordance of microbial genera found in the intestinal and respiratory microbiota of these patients as well as growth in diversity over time (101). For some bacterial genera, intestinal colonization preceded appearance in the respiratory tract

(101). This demonstrates that the digestive pathway should be given more consideration as a potential infectious gateway in these patients, given the repercussions on pro-oxidant/anti-oxidant balance (**Fig. 1**).

2.3.2 Intestinal antioxidant defense system

Intestinal antioxidant defense is as well organized in the intestinal lumen as in the epithelium and the plasma environment. This defense involves various factors whose intricate actions ensure intestinal redox equilibrium, namely diet, biliary secretion, intestinal microbiota, redox couples and their related enzymes.

(i) Intestinal lumen

A deficiency in the secretion of biliary and pancreatic lipase is well known in CF and constitutes the principal etiology of intestinal malabsorption (52). GSH from the intestinal lumen comes from the diet, *de novo* synthesis and biliary secretion, which corresponds to 50% of hepatic GSH (10). Luminal GSH is involved in trapping divalent metals, maintaining mucus fluidity, capturing peroxidized lipids and reducing their lymphatic transport (9,36,75). Any abnormality in biliary secretion could therefore influence intestinal luminal redox equilibrium by disturbing GSH metabolism. Gpx3 participates in the cytoprotection of intestinal mucus against luminal oxidizing agents (7,31). In addition, the GSH/GSSG closely participates in the predominant role of Cys/CySS couple in luminal redox equilibrium. This Cys comes from the diet, thiol-disulfide exchange reactions, a reduction of CySS and GSH hydrolysis, which provide about 40%. Cys is considered to be the determinant of luminal redox potential in the gut (35).

Intestinal microbiota consisting of 500 to 1,000 bacterial species prevents colonization by pathogens, supports intestinal nutrition and regulates the mucosal immune system. In addition, this microbiota produces hydrogen sulfide in millimolar concentrations that is capable of preventing the inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase, ROS production,

GSH redox disequilibrium and OxS (95). These various functions underscore the participation of intestinal microbiota in intestinal antioxidant defense.

(ii) Intestinal epithelium

Antioxidant defense of the intestinal epithelium is for the most part ensured by GSH via GSH-dependent enzymes. GSH is the predominant thiol at the intracellular level of which it is the determinant of redox potential (31) where it is present in an essentially reduced form (63). Cellular GSH consists of various localized pools in the cytosol, mitochondria, ER and nucleus (11,39,85). There is a difference in redox potential between these compartments based on their metabolic and biological specificities (11). GSH-derived enzymes such as Grx and Gpx are involved in intestinal antioxidant defense at various levels. Isoenzymes from Grx1 and Grx2 found in the cytosol and mitochondria, participate in GSSG reduction (46). Grx3 is implicated in various regulatory processes such as embryo development, immune response and cardiac physiology. Its implication is believed to occur through direct and specific interaction with other proteins in response to ROS-induced signaling (69). The four isoenzymes of Gpx, including Gpx2 (specific to the gut), reduce various forms of H₂O₂. Gpx1 and Gpx2 are two related cytosolic enzymes in terms of their structure and specificity for H₂O₂ and FA hydroperoxides. Gpx1 is also located in the mitochondria (26). Gpx3, in addition to the two preceding types of peroxides, reduces phospholipid (PL) but not cholesterol hydroperoxides. Gpx4 is present in cytosol, mitochondria and the nucleus and reduces PL hydroperoxides, cholesterol and thymine. Gpx4 is involved in the prevention of lipid peroxidation in synergy with vitamin E (26). Intestinal Trx(SH)₂ is well known for its role in intestinal immune response and innate immunity. Strongly expressed in intestinal mucus, it is involved in the antimicrobial defense of human β -defensin 1 at the epithelial level in humans and is in fact recognized as being a physiological mediator that catalyzes the reduction of this peptide (138). Intestinal Trx(SH)₂ also participates in antioxidant defense

and the regulation of redox equilibrium by CySS reduction (58,67). CoQ10, as previously described, is a powerful inhibitor of lipid peroxidation (63), which exerts its antioxidant action in the mitochondria and also in lipid membranes by trapping oxygen radicals. The mitochondria, membrane PL, serum PUFAs and lipoproteins such as low density lipoprotein are then protected from OxS (119). The combination of these different antioxidant actions could contribute toward preserving the redox equilibrium of the cell itself.

(iii) Extracellular compartment (plasma and interstitial environment).

The two redox couples found in this compartment are GSH/GSSG and Cys/CySS (31,67). Their redox status in the compartment is highly more oxidized than in cellular cytoplasm. It is so well oxidized that CySS is considered the major determinant of redox potential in this compartment (36). The redox status of extracellular GSH/GSSG is considered to be the best reflection of tissular antioxidant defense, whereas that of extracellular Cys/CySS appears to regulate cell functions (80,110). In fact, associations have been established between the oxidized status of Cys/CySS and the presence of various cardiometabolic pathologies (56). The implication of GSH in the reduction of CySS in this compartment therefore appears essential for the prevention of these chronic pathologies. The predominant role of GSH in the organization of antioxidant defense in general and of the intestine in particular highlights the importance of a functional CFTR protein in maintaining the homeostasis of exocrine epithelial cells.

3 MITOCHONDRIAL FUNCTIONS AND CF

3.1 β -oxidation FAs and oxidative phosphorylation

Mitochondria are oval-shaped organelles which constitute a dynamic network in the cytoplasm of all cells. They are surrounded by two membranes consisting of PLs and separated by an intermembrane space. They possess their own genetic material and numerous functionalities, the most important of which is the production of energy by FA β -oxidation

and oxidative phosphorylation (91). Short- and medium-chain FAs penetrate directly into the mitochondria, whereas long-chain FAs are first activated in cytosolic acyl-CoA under the action of acyl-CoA synthetase. This enzyme belongs to the acyl thiokinase family of cytoplasmic enzymes that bind FAs to coenzyme A by using energy from the hydrolysis of ATP in adenosine monophosphate and pyrophosphate. Acyl-CoA then enters the carnitine cycle and is transformed into acyl-carnitine while passing through mitochondrial membranes before being retransformed into acyl-CoA in the mitochondrial matrix. Acyl CoA is oxidized into acetyl-CoA via the β -oxidation cycle. This cycle, still called Linen's spiral, consists of a succession of four enzymatic reactions. The first is dehydrogenation by acyl-CoA dehydrogenase, which has FAD as a cofactor. This reaction results in trans- Δ -Enoyl-CoA and FADH₂ and involves electron-transferring flavoprotein (ETF). The identification of the mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases was followed by the identification of the ETF as their common electron acceptor (100). It is now recognized that electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase (ETF-QOR), a component of the mitochondrial respiratory chain, together with ETF forms a short pathway that transfers electrons from 11 different mitochondrial flavoprotein dehydrogenases to the ubiquinone pool (CoQ10) in the mitochondrial inner membrane (127,133,141) The electrons can then passed to complex III (CIII) of the respiratory chain, cytochrome *c*, complex IV (CIV), and finally molecular oxygen (154). CoQ10 serves as a link between the β -oxidation of FAs and the mitochondrial respiratory chain. The ETF/ETF-QOR system has also been described as a likely source of O₂⁻ / H₂O₂ production like sites of the respiratory chain. Some studies report that the holders of a multiple acyl CoA deficiency patients dehydrogenase sensitive to riboflavin, associated with changes in protein structure ETF-QOR also have a secondary CoQ10 deficiency and increased rates of mitochondrial ROS. The production of these ROS would be linked to the defective protein that promotes ETF-QOR electron leakage reacting with molecular oxygen

(33). In the context of CF, ETF-QOR characteristics are not well known and are worth exploring because of the known CI inhibition and potential deficiency of CoQ10. Indeed, changes in the gene ETF dehydrogenase that encodes the protein ETF-QOR have been associated with CoQ10 deficiency but also a deficiency in the respiratory chain (33).

The second reaction consists of enoyl-CoA hydration by enoyl-CoA hydratase and results in 3-OH-acyl-CoA. It is followed by a second reaction of dehydrogenation by 3-OH-acyl-CoA dehydrogenase with NAD as a cofactor. The final reaction involves splitting by 3-ketothiolase into acetyl-CoA, the final product of the β -oxidation cycle, and also NADH and FADH₂ (91,98). This acetyl-CoA can be completely degraded by the Krebs cycle (with CO₂, NADH and FADH₂ production) or result in the formation of ketone bodies in the liver (91). NADH and FADH₂ derived from β -oxidation and the Krebs cycle provide various complexes of the phosphorylation oxidative system with electrons (45) (**Fig. 2**).

The mitochondrial respiratory chain is a metabolic pathway that generates energy for adenosine diphosphate (ADP) phosphorylation into ATP. This energy comes from the oxidation of hydrogen transport enzymes (FAD, NAD and CoQ10) and electrons (cytochrome c). The mitochondrial respiratory chain functions at the level of the internal mitochondrial membrane and consists of five enzyme complexes (136): (i)

CI or NADH ubiquinone oxidoreductase has flavin mononucleotide and iron-sulfur centers as cofactors. Its substrate is hydrogen provided by NADH from which it catalyzes oxidation. This hydrogen is then transported toward CoQ10 located in lipid membranes to ensure its reduction. (ii)

(CII) or succinate ubiquinone oxidoreductase has the particularity of also belonging to both the mitochondrial respiratory chain and the Krebs cycle. It has FAD and iron-sulfur centers as cofactors. Its substrate, succinate, is oxidized into fumarate and hydrogen transported toward

CoQ10. (iii)

CIII or ubiquinone-cytochrome c oxidoreductase has cytochrome b and iron-sulfur centers as cofactors. Its substrate is composed of hydrogen atoms brought by reduced CoQ10 from which it catalyzes oxidation. Their electrons are then transported toward cytochrome c. (iv)

CIV or cytochrome c oxidase has cytochrome with the nuclei of two heme-iron moieties (a and a₃) as a cofactor. Each nucleus is associated with a copper atom. Its substrate is made of electrons brought by cytochrome c from the intermembrane space from which it catalyzes oxidization. These electrons are transported by the enzyme toward the oxygen of the respiration that diffuses vessels toward the mitochondrial matrix to form water. (v)

CV or mitochondrial ATPase pumps protons toward the matrix space from the intermembrane space into which they have been displaced by the various preceding oxido-reduction reactions from this space. It uses the energy to this effect generated by the other enzyme complexes for the phosphorylation of ADP into ATP. The return of protons toward the mitochondrial matrix can also be done outside ATPase via decoupling proteins (UCP1, UCP2 et UCP3), thereby resulting in the dissipation of the energy in the form of heat (129) (**Fig. 3**).

ATP generated by the mitochondria is used in the functioning of various organs such as the heart, liver, muscles (98) and certain structures like CFTR protein. In fact, the opening and closing mechanism of the CFTR channel involves ATP and cAMP (76,153). This underlines the need for a stable mitochondrial metabolism to allow the optimal functioning of the CFTR protein.

Abnormalities in the mitochondrial respiratory chain, particularly the selective loss of the functionality of CI, have been reported in the context of CF. This inhibition of CI coupled with the over-oxidation of NADH is presented by some authors as a consequence of intra mitochondrial redox disequilibrium resulting from ROS over-production and mitochondrial GSH depletion (84). Other studies report that this functional loss of CI in CF cells is believed

to stem from the weak expression of the mitochondrial gene coding for the *MTND4* sub-unit of CI, as the sub-unit is responsible for the assembly and activity of the complex (149). They underline in this regard the association that exists between defective CFTR and the functional inhibition of CI. Variations in the kinetics of CI among CF patients, heterozygous subjects and controlled subjects had been suggested after *in vitro* study findings before the discover of the *CFTR* gene (139). In fact, CI kinetics is reduced in CF patients. The authors suggest the existence of an association between the CF gene and mitochondrial CI after having eliminated a post-translational glycosylation difference in the enzyme, a difference in the interaction of PLs from the internal mitochondrial membrane on the binding site of the enzyme, and finally a difference in the effect of mitochondrial calcium on the Michaelis constant (139). The probable association of CF with intracellular membrane abnormalities in the same context, however, is supported by certain authors (38). There is scant mention of the dysfunction of other mitochondrial respiratory chain enzymes in the context of CF in the literature (4). It should be noted that these studies have been carried out for the most part on cutaneous fibroblasts and white blood cells. The characteristics of the mitochondrial respiratory chain in the intestine of CF patients remain to be discovered.

The mitochondrial respiratory chain generates ROS in weak or moderate proportions over the course of its physiological development (97). The production of O_2^- has thus been reported at the level of CI, CII and CIII.

As mentioned before, CI constitutes a major entry point for electrons to the respiratory chain in mitochondria (71). This complex oxidizes NADH to NAD^+ , by the reduced flavin mononucleotide (88), reduces ubiquinone to ubiquinol, and uses the redox potential difference to translocate protons across the mitochondrial inner membrane. It also represents a substantial source of cellular ROS (72,113). In the presence of NADH, mitochondria reduce O_2 to predominantly O_2^- that dismutates rapidly to produce H_2O_2 (88). Noteworthy, the

NAD⁺/NADH ratio determines the number of CI molecules (that have a fully reduced flavin) and the binding site occupancy, thereby explaining how the composition of the mitochondrial NAD⁺ pool may affect ROS production (14). Overall, these observations establish the direct links between NAD(P)H oxidation state and ROS production in mitochondria (87) and they especially specify that the CI flavin-site mechanism is behind many of the functional characteristics of O₂⁻ and H₂O₂ production by mitochondria. The binding site of ubiquinone was also identified as the source of production of O₂⁻ in the presence of a proton motive force and a significant pH gradient during the reverse flow of electrons from the pool of reduced ubiquinone, which supports ATP synthesis and many transport processes (148). Some studies have shown that the flavin site of CI is as well capable of producing O₂⁻ / H₂O₂ at high levels in the β-oxidation of FAs and in the reverse electron flow from the pool of reduced CoQ10 (122). Indeed, inhibition of CII leads to diminished O₂⁻ production during the reverse flow of electrons (42). The central CIII of the respiratory chain seems also to contribute to the production of O₂⁻ through its catalytic active site and during the oxidation of ubiquinone passing through the auto-oxidation stage of the semi-ubiquinone controlled by a delicate balance between membrane potential, reduced availability and oxidized forms of ubiquinone and the redox status of CIII (55,65). However, in CF, a more complete investigation is required to obtain a better understanding of mitochondrion contribution, ROS production and the etiopathology.

O₂⁻ from CI is released in the mitochondrial matrix where it is converted by Mn-SOD into H₂O₂ and O₂ accounted for by GSH, CAT and Trx(SH)₂. That of CIII is released into the matrix and intermembrane space (64).

Non-mitochondrial ROS are thought to originate from the degradation of purine, the degradation of very-long-chain and branched-chain FAs in the peroxisome, the activity of plasma membrane NOX and finally hydroxylation reactions catalyzed by microsomal

cytochrome P450 (137). The production of ROS and nitrogen species is a physiological phenomenon strictly regulated by enzymes such as nitric oxide synthase and the isoforms of NOX (150). Mitochondria equipped with a high-level antioxidant defense system inhibit the harmful action of ROS through Mn-SOD, matrix GSH, Gpx, Trx(SH)₂ and CAT (63,97,137). Within a context of OxS with a disequilibrium of the redox balance, pro-oxidant agents increase, whereas antioxidant defense decrease (63,159). This oxidative environment leads to apoptosis, an increase in synthesis and secretion, impairment of ionic transport systems, including chlorine secretion and dysregulation of cytosolic calcium (20,115). Some authors report the existence of an association of ROS production, defective mitochondria and mitochondrial GSH loss (64,137). The exact chronology of these different events, however, remains to be established. By considering the known role of CFTR in GSH transport and the low GSH content in bronchial epithelial fluid even in the absence of infection, it is conceivable that, within the context of CF, low mitochondrial GSH content would be earlier than the other two events. Mitochondrial GSH cannot be synthesized *de novo*. It is pumped by the mitochondria from GSH contained in the cytosol, which explains the similarity of GSH concentrations in these two compartments (67). The absence of CFTR protein responsible for GSH transport from the intestinal lumen to the cytosol could lead to low cytosolic and therefore low mitochondrial GSH content. This would reduce the antioxidant capacities of the mitochondria in the face of a physiological production of ROS and expose it to the occurrence of various types of damage. The impact of OxS on mitochondrial metabolism is well known and has been described by various authors outside the CF context. Lipid peroxidation induced *in vitro* by the iron/ascorbate couple leads to a disruption of mitochondrial function in Caco2/15 intestinal epithelial cell line (145). The dysregulation results in an increase in 8-OH deoxyguanosine (evidence of DNA) lesions and a decrease in its repairing enzyme (146). Studies report that

intracellular OxS induces mitochondrial DNA (mtDNA) lesions (66) that would seem to precede cell nuclear damage (115). As a result of this high sensitivity to OxS, quantification of mtDNA damage in the blood has been proposed as a more sensitive marker of systemic OxS (22). A decrease in ATP production, a dysregulation of calcium homeostasis, an increase in cytochrome c, apoptosis-inducing factor and mitochondrial transcription factors have also been mentioned (146). Other *in vivo* studies performed on rat hepatocytes submitted to OxS report, in addition to the aforementioned disorders, a significant decrease in mitochondrial antioxidative enzymes (Mn-SOD, Gpx, GSH), dehydrogenase activities and respiratory chain complexes. Similarly, a decrease in membrane potential, the transitory permeability of the mitochondrial membrane with pore opening and triggering of inflammatory responses have also been reported (145).

3.2 Role of FAs in the modulation of ROS production

Dietary FAs following digestion and intestinal absorption are transported in the blood in the form of chylomicrons (17). In plasma, the action of lipoprotein lipase gives rise to non-esterified FAs, a fraction of which binds to albumin. The unbound fraction, free FAs, is captured by adipose tissue, muscles and peripheral tissue. Chylomicron residues go to the liver (17).

The intracellular mechanisms of FAs are variable and mainly occur in cell membranes, mitochondria (β oxidation) and the nucleus. FAs enter the composition of the PLs of the membranes of all the body's cells and play a structural role through their capacity to modulate membrane permeability. They also influence ratios between PLs and membrane proteins (17,143). Membrane PLs can be synthesized *de novo* or undergo a modification of their FA composition via a remodeling mechanism. This remodeling consists of the hydrolysis of a PL FA under the action of PLA1 and PLA2. It results in the release of signaling molecules such as ceramides, diglycerides and lysoderivatives as well as the synthesis of eicosanoids

(inflammation mediators) when the FA that is released is AA (17). These membrane FAs also regulate protein channels and functions. They are for this reason considered to be important signaling regulators (143). Their nuclear actions result in the modulation of gene expression (17,143).

The role of FAs in the genesis of inflammation is well known. CFTR dysfunction has been associated with an increase in the expression of PLA2, an increase in the expression and activity of cyclooxygenase-2, resulting in an increase in prostaglandin E2 production (13,105). This PLA2 increase would seem to justify the increase in the release of AA from membrane cells and therefore the constant inflammation found in CF. Overall, these abnormalities reflect the structural membrane disruption as described in oxidative denaturation of membrane lipids.

Lipid peroxidation is a chain reaction that starts when $\text{OH}\cdot$ or O_2^- , tear a hydrogen atom from unsaturated FA esters of lipid membranes (117) thereby altering membrane potential and permeability, and functionality of membrane enzymes and receptors (27). Lipid peroxidation generates hydroperoxides from unstable lipids, a process catalyzed by various compounds such as transition metals. The products of this degradation include malondialdehyde that alters membrane fluidity and function, 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) and 4-oxo-nonenal (NEB) that react with DNA to form adducts responsible for mutagenic chemical modifications of DNA bases (41,93). In the absence of inhibitor of lipid peroxidation (e.g. CoQ10 and vitamin E) as would likely be the case in CF, lipid peroxidation products form protein adducts and activates various signaling pathways with a cascade of kinases. They can also form a cytosolic glutathionyl-4-hydroxy-2-nonenal (GS-HNE) complex whose persistence in the cytoplasm (due to antibody binding protein1 Ral or RLIP76) contributes to OxS and thus to inflammation. The RLIP76 is a protein that catalyzes the ATP-dependent transport of GSH and GS-HNE and allows their excretion into the extracellular medium (118). Nevertheless, fat-soluble antioxidants and GSH are key players in the prevention of lipid peroxidation and

adverse effects of its metabolites.

The implication of FAs in the modulation of ROS production was suggested following various reports of association that exist between an increase in free FAs, an increase in ROS levels and a decrease in antioxidant enzymatic activities. ROS cell production induced by free FAs is believed to take place in the mitochondria, ER and phagocytic neutrophils via the NOX system for which the arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol are particularly known as stimulators of O_2^- generation (137,159).

FAs have numerous interactions with the mitochondria and can modulate mitochondrial ROS production directly by β -oxidation through a decoupling effect (115). The literature reports that the implication of FAs at the level of the mitochondrial respiratory chain has a dual effect (115,137). In fact, they can block intracellular OxS or, on the other hand, inhibit the respiratory chain and favor an increase in the generation of H_2O_2 when their doses are elevated (115). The mechanisms by which FAs interfere with the respiratory chain vary and have been described outside the CF context (137):

(i) Inhibition/reinforcement of reverse electron transport from the CoQ10 pool to CI

This transport is associated with O_2^- production and requires a high transmembrane ($\Delta\psi$) potential. Free FAs through their protonophoric effect reduce O_2^- production by CI via $\Delta\psi$ reduction. On the other hand, β -oxidation of acyl CoA could reinforce reverse electron transport and thereby increase O_2^- production by CI. An *in vitro* study conducted on vascular cells that used oleic acid due to its reduced sensitivity to oxidation revealed that this FA inhibits ROS production without however inducing $\Delta\psi$ modifications. The authors reject the inhibition of ROS production via an FA decoupling effect (115).

(ii) Inhibition of electron transport through CI and CIII

Free FAs exert a partial inhibition of electron transport through CI and CIII, thereby favoring their loss and allowing the reduction of O_2 into O_2^-

(iii) Possible interference with the GSH system

Free FAs could inhibit GSH regeneration from GSSG and thereby prevent the neutralization of H₂O₂ by Gpx. However, some authors report the capacity of oleic acid to stimulate Gpx activation via the activation of the epidermal growth factor receptor (115).

(iv) Modulation of internal mitochondrial membrane fluidity

Free FAs are able to modify the fluidity of the internal mitochondrial membrane and thereby facilitate O₂ access to electron donor sites, thereby increasing O₂⁻ production.

(v) Detachment of cardiolipin bound to cytochrome c

Free FAs are able to detach cardiolipin bound to cytochrome c on the external aspect of the internal mitochondrial membrane, which results in a reinforcement of the reduction status of electron transporters located upstream.

These different mechanisms, while being described outside the CF context, highlight the capacity of FAs to modulate ROS production *in vitro* by acting at different steps of the mitochondrial respiratory chain. A much more recent *in vivo* study conducted on renal tubules of recently evolved type 1 diabetic rats shows FA oxidation and not the respiratory chain as the source of ROS hyperproduction by the mitochondria in this context (130). The authors identify ETF as the main site of electron leakage. These variable data justify an exploration of mitochondrial metabolism in the specific context of CF where the exact origin of OxS and the link to FA disequilibrium have yet to be elucidated.

3.3 Probable existence of a deterioration in mitochondrial functions in CF

Some authors have reported specific characteristics of the mitochondria in CF. *In vitro* studies on CF respiratory epithelial cells (Δ F508 mutation) have highlighted a fragmented and dispersed mitochondrial network, a depolarized and therefore reduced transmembrane potential and a reduction in calcium sequestration capacity by the mitochondria (2). This mitochondrial capture is mediated by the mitochondrial calcium uniporter whose functioning

depends on the intensity of the $\Delta\psi$ membrane potential (2).

This $\Delta\psi$ depolarization could also be incriminated in low mitochondrial GSH content, since it pumps cytosolic GSH (67). Another study, however, shows that mitochondrial GSH depletion is not due to defective transport even though a reduction in mitochondrial GSH transporters was observed (84). The authors of this study report GSH depletion associated with ROS over-production and the oxidative environment that reigns within the mitochondria, the consequence being CI inhibition with over-oxidation of NADH, $\Delta\psi$ depolarization and IL-8 secretion anomaly by CF cells. This $\Delta\psi$ depolarization has also been described as an initial step in the apoptosis process (137). Mitochondrial ROS over-production has also been associated with modifications to the fluidity of the internal mitochondrial membrane leading to an increase in O₂ capture (137).

The incorporation EFAs in membrane PLs seems to be influenced by chlorine channels including CFTR. Studies report a deficit in incorporating linoleic acid in the PLs of CF epithelial membranes (13).

These various reported associations, the known effects of OxS on the mitochondria and their similarity to the described characteristics as well as the impact of CFTR deficit on the structure and functioning of cell membranes suggest a probable oxidative origin for mitochondrial metabolism disorders in CF. The lipid abnormalities observed in CF could also be related to this oxidative context given the interconnectedness of both metabolisms (mitochondria and FAs) (**Table 1**).

4 ANTIOXIDANT AND/OR FA INTERVENTION STUDIES IN CF

4.1 Antioxidants

There has been renewed interest in antioxidants in CF following various observational studies that reported an association of low levels of antioxidants, increased OxS markers and impaired clinical condition in patients (8,62,90,157,159). Their incorporation into patient

management protocols in the form of routine supplementation has therefore been widespread. However, certain studies aimed at evaluating the effects of this type of supplementation in CF patients have revealed generally low levels of antioxidants (CoQ 10, α tocopherol, vitamin A, GSH) (8,62,77,90,119,159), more or less casting doubt on their efficacy. This was the motivation for various intervention studies aimed at supplementing patients over a determined period and evaluating the impact on their antioxidant profile. These ad hoc supplementations consisted for the most part of vitamins (E or A). In certain cases, they were vitamin complexes with minerals such as selenium. The findings of these studies were mixed. In fact, antioxidant serum levels could be normal, increased or low in supplemented patients within the same study (73). The increase in antioxidant vitamin serum levels occurred with respect to the other liposoluble vitamins (D and K). Respiratory function barely improved and the negligible reduction in urinary 8-isoprostanes meant any impact of this supplementation on OxS was unlikely (134,161). Some authors also reported a resistance to oxidation correlated with α -tocopherol levels in low density lipoprotein and a reduction in malondialdehyde (156) (**Table 2**).

Considering the lack of efficacy of antioxidants, one might assume that, in CF, OxS goes far beyond intestinal fat and fat-soluble vitamin malabsorptions. It seems to result from more complex mechanisms other than dietary intake deficit since increased plasma antioxidants coexists with the presence of OxS markers (43,161). The failure to fully eliminate ROS production by adequate supplementation could partly be explained by the persistence of OxS (159). In particular, homeostasis deregulation of the major redox couples appears as a very likely explanation especially as CFTR^{-/-}-induced GSH deficit may profoundly disrupt signaling and redox control concomitantly with or without changes in pro-oxidant/antioxidant balance (67). Both the involvement of these redox couples and the alterations in the regulation of inflammation by various transcription factors justify further mechanism

exploration in the context of CF.

4.2 Fatty acids

The aim of routine administration of gastro-resistant pancreatic extracts combined with a high-fat high-calorie diet is to improve FA imbalance in CF patients. However, various studies show the limited impact of this routine therapy on patients' clinical conditions. In fact, a negligible improvement in anthropometric measures, an increase in saturated FAs and monounsaturated FAs, an increase in DHA/AA ratio and onset of diabetes-type hepatic and metabolic complications have been reported (34,49,77,108). Some authors also mention significantly low levels of vitamin E associated with significantly high levels of oxysterols in patients with pancreatic insufficiency or diabetes. These two groups of patients presented more markers of impaired FA profiles (77).

FA supplementation studies have been carried out in both animals and humans. In *in vivo* studies, supplementation most often consisted of DHA. This intake corrected DHA levels with a significant DHA/AA ratio increase in most tissues and membrane PLs. In some cases, this was associated with n-6 pathway impairment in CF target organs and the changes observed in long chain PUFA levels varied according to tissue and mouse type (107). Other studies mention that DHA administration led to a reduction in eicosanoid levels in *cfr-/-* mice previously exposed to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides as well as a negligible decrease in tumor necrosis factor α (50).

Clinical studies on supplementation have revealed certain interactions between FAs and other biological constants. They have reported that the FA profile of CF patients depends on their clinical, nutritional, respiratory and oxidative conditions (43). In fact, FA plasma concentrations significantly influence the increase of 8-iso-Prostaglandin F2 α concentrations and the improvement of respiratory functions (161). An adequate nutritional intake in CF patients aimed at enhancing FA plasma concentrations is believed to lead to similar responses

from an oxidative and respiratory aspect (161). Similarly, antibiotherapy administered over the course of pulmonary exacerbations leads to an increase in FAs, vitamins A, E and lipid peroxidation markers (43,161). The adverse effects of OxS on respiratory function could therefore be inhibited by effective antioxidant supplementation (161). These findings are, however, contradicted by other authors who demonstrated the absence of a correlation in EFAD, nutritional and clinical conditions and vitamin E and zinc serum levels. They state that this deficiency is thought to be linked more to the genotype than to lipid peroxidation (144). These studies highlight the association of FA imbalance with an increase in OxS markers and an impairment of antioxidant defense mechanisms in CF patients. Routine supplementation appears to be of little benefit in the long term in view of persistent underlying abnormalities and the onset of metabolic complications. As the results of ad hoc supplementations were various, objective conclusions cannot be made. It is, however, admitted that the administration of FAs enhances their plasma content while increasing OxS markers. Nevertheless, there is little consensus on the benefit of this correction to the clinical profile of CF patients (**Table 3**).

CONCLUSION

The existence of FA imbalance in CF patients as well as the implication of OxS in the pathophysiology of certain disorders encountered in this disease has been demonstrated. The close link that exists between FA metabolism and the endogenous genesis of ROS, particularly at the mitochondrial level, has been widely reported in the literature. The similarity that exists between the characteristics of the mitochondria in CF and the context of OxS could rightfully suggest a probable oxidative origin for mitochondrial metabolism disorders in CF. The innate GSH transport defect in CF patients could contribute to generating an overall oxidative environment at the mitochondrial level. On the other hand, the disruption of mitochondrial redox balance, by having an impact on mitochondrial functioning, could influence FA metabolism. The low impact of a high-fat high-calorie diet on correcting lipid profile, improving patient clinical condition and preventing metabolic decompensations are a concern. In addition, an increase in OxS markers with this type of diet without correction by antioxidant vitamin supplementation raises concerns. Considering re-establishing mitochondrial redox balance and judging its impact on lipid profile would be a promising option. Investigating the role of OxS in the modulation of lipid intestinal metabolism in CF patients could help elucidate persistent FA imbalance despite the intake of gastro-resistant pancreatic extracts and a high-fat diet.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mrs Schohraya Spahis for her technical assistance.

The current work was supported by research grants from the Canadian Cystic Fibrosis Foundation and the JA deSève Research Chair in nutrition (EL).

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

The authors declare that they have no competing financial interests.

LIST OF ABBREVIATIONS

AA;	Arachidonic acid
ADP;	Adenosine diphosphate
AP-1;	Activator protein-1
ARE;	Antioxidant response element
ATP;	Adenosine triphosphate
cAMP;	Cyclic adenosine monophosphate
CAT;	Catalase
CF;	Cystic fibrosis
CFTR;	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CoQ10;	Coenzyme Q10
CI;	Complex I
CII;	Complex II
CIII;	Complex III
Cys/CySS;	Cysteine/cystine
DHA;	Docosahexaenoic acid
EFA;	Essential fatty acid
EFAD;	Essential fatty acid deficiency
ER;	Endoplasmic reticulum
ETF;	Electron-transferring flavoprotein
ETF-QOR;	Electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase
FA;	Fatty acids
FAD;	Flavin adenine dinucleotide
Gpx;	Glutathione peroxidase
Grx;	Glutathione reductase
GSH/GSSG;	Glutathione/glutathione disulfide
GSH;	Glutathione
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
IL;	Interleukin

mtDNA;	Mitochondrial DNA
NADH;	Nicotinamide adenine dinucleotide
Nrf2;	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NOX;	NADPH Oxydase
O_2^-	Superoxide anion
$OH\cdot$	Hydroxyl radical
OxS	Oxidative stress
SOD;	Superoxide dismutase
PL	Phospholipides
PLA2	Phospholipases A2
PUFA;	Polyunsaturated fatty acids
ROS;	Reactive oxygen species
Trx(SH) ₂ /Trx-SS;	Thioredoxin/ thioredoxin oxidized

Table 1: Comparison of mitochondria oxidative stress disorders to those with Cystic fibrosis

MITOCHONDRIAL CHARACTERISTICS	
Oxidative stress	Cystic fibrosis
MtDNA lesions	Fragmented and dispersed mitochondrial network
Calcium homeostasis dysregulation	Decreased calcium sequestration
Increase of AIF, cytochrome C, FT	Apoptosis
Decrease of Mn-SOD, Gpx, GSH	Depletion of GSH and redox imbalance
Inhibition of respiratory chain complexes	Functional inhibition of CI and overproduction of ROS
Decrease of ATP production	
Decline of membrane potential	Transmembrane potential depolarization
Membrane permeability	Changes in membrane fluidity

Table 2: Impact of antioxidant supplementation among cystic fibrosis patients

Source of antioxidant	Oxidative markers	Antioxidant markers	Clinical impact
Usual treatment		↓ Carotenoids (8,62,159)	↓ Clinical status (8)
	↑ Malondialdehyde (8)	↓ α tocopherol (8,62,159)	↓ Lung function (62,159)
	↑ 8-isoprostanes (8,159)	↓ Vitamin C (8,159)	
		↓ CoQ 10 (119)	
Punctual supplementation		↑ Carotenoids (134,156,161)	↑ Lung function (161)
		↓ α tocopherol (73)	
		↑ α tocopherol (73,161)	
		↔ α tocopherol (73)	
	↓ Malondialdehyde (156)	↑ γ tocopherol (134)	
	↑ 8- isoprostanes (161)	↔ γ tocopherol (156)	
		↓ Glutathione peroxidase (161)	
	↑ CoQ 10 (134)		

Table 3: Impact of lipid supplementation in cystic fibrosis

Type of intervention	Oxidative markers	Antioxidant and inflammatory markers	Lipid profile	Clinical status
Usual treatment (PERT +FSV+HFHCD Antibiotic therapy)	↑ Oxysterols (77) ↑ Malondialdehyde (43)	↓ α tocopherol (77) ↑ Carotenoids (43)	↓ PUFA (34)	↔ Anthropometry (108) Metabolic disorders (108)
			↓ DHA (49) ↑ AA (49) ↑ SFA (34,108) ↓ MUFA (34,108)	
Punctual supplementation		↑ Eicosanoids (50)	↔ DHA (107,156)	Eicosanoid decreased by DHA (50)
GPL + DHA++ (107)*		↓ Cytokines (50)	↓ LA (107,156)	
Multivitamins + α tocopherol (144)			↑ AA (107) ↔ AA (156)	
LPS + DHA (50)*			↑ DGLA (107)	

PERT = pancreatic enzyme replacement therapy, FSV= fat-soluble vitamins, HFHCD = High fat high calorie diet, GPL = glycerophospholipids
DHA = docosahexaenoic acid, LPS = lipopolysaccharide, PUFA = Polyunsaturated fatty acids, SFA = Saturated fatty acid, MUFA = Monounsaturated fatty acid, AA = arachidonic acid, LA = linoleic acid, DGLA = dihomog- γ -linolenic acid, * = in vivo studies

FIGURE LEGEND

Figure 1: Potential origins of OxS in the cystic fibrosis intestine

OxS in CF intestine could result from various dysfunctions implying the lungs, liver, mitochondria, plasma and intestine itself. Chronic inflammation, infection, endogenous antioxidant vitamins deficiency and an impaired homeostasis of glutathione are the main causes.

Figure 2: Fatty acid β oxidation

The long chain fatty acids need to be processed in cytoplasm before entering in the mitochondria, while the short and medium one directly going in. Carnitine palmitoyl transferase1 (CPT1) catalyzes the conversion of Acyl-CoA in Acyl carnitine, which is able to pass through the mitochondrial membranes. Carnitine palmitoyl transferase 2 (CPT2) dissociates Acyl carnitine in Acyl-CoA and carnitine before the beginning of β -oxidation. Electron-Transferring Flavoprotein/Electron Transferring Flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase system transfers electron from acyl CoA dehydrogenases to ubiquinone pool located in the inner membrane of mitochondria. Acetyl-CoA, the major metabolite of β -oxidation goes into the Krebs cycle or is converted into ketone bodies.

Figure 3: Mitochondrial respiratory chain

Complex I (CI) and complex II (CII) respectively oxidize nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and flavin adenine dinucleotide (FADH₂) that come from β oxidation and Krebs cycle. Coenzyme Q (CoQ) or ubiquinone is the principal electron's carrier between CI, CII and complex III (CIII). ROS produced by CI are released into the mitochondrial matrix while those from CIII into the intermembrane space. CII could generate superoxide anion radical during specific conditions in which succinate is the main supplier of electrons to the respiratory chain. Hydrogen anions transferred from mitochondrial matrix to intermembrane space accompany metabolisms that occur in the CI and CIII. There will be used later by

complex V (CV) for generating ATP.

FMN = flavin mononucleotide; c = cytochrome c; IIIQo = catalytic active site of CIII;

e- = electrons; UCP= uncoupling proteins

REFERENCES

1. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology & Medicine* 28: 463-99, 2000.
2. Antigny F, Girardin N, Raveau D, Frieden M, Becq F, Vandebrouck C. Dysfunction of mitochondria Ca²⁺ uptake in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Mitochondrion* 9: 232-41, 2009.
3. Antigny F, Norez C, Becq F, Vandebrouck C. Calcium homeostasis is abnormal in cystic fibrosis airway epithelial cells but is normalized after rescue of F508del-CFTR. *Cell Calcium* 43: 175-83, 2008.
4. Antonowicz I, Sippell WG, Shwachman H. Cystic Fibrosis: Lysosomal and Mitochondrial Enzyme Activities of Lymphoid Cell Lines. *Pediatric Research* 6: 10, 1972.
5. Arnér ESJ, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry* 267: 8, 2000.
6. Aw TY. Cellular Redox: A Modulator of Intestinal Epithelial Cell proliferation *Physiology and Behavior* 18: 5, 2003.
7. Aw TY. Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicol Appl Pharmacol* 204: 320-8, 2005.
8. Back E, Frindt C, Nohr D, Frank J, Ziebach R, Stern M, Ranke M, Biesalski HK. Antioxidant deficiency in cystic fibrosis: when is the right time to take action? *American Journal of Clinical Nutrition* 80: 11, 2004.
9. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological Chemistry* 390: 191-214, 2009.
10. Ballatori N, Rebbeor JF. Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione. *Seminars in Liver Disease* 18: 377-87, 1998.
11. Bass R, Ruddock LW, Klappa P, Freedman RB. A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. *J Biol Chem* 279: 5257-62, 2004.
12. Becker KA, Tummler B, Gulbins E, Grassme H. Accumulation of ceramide in the trachea and intestine of cystic fibrosis mice causes inflammation and cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 403: 368-74, 2010.
13. Bhura-Bandali FN, Suh M, Man SFP, Clandinin MT. The DF508 Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance. *The journal of nutrition* 130: 6, 2000.
14. Birrell JA, Morina K, Bridges HR, Friedrich T, Hirst J. Investigating the function of [2Fe-2S] cluster N1a, the off-pathway cluster in complex I, by manipulating its reduction potential. *Biochem J* 456: 139-46, 2013.
15. Biswas S, Chida AS, Rahman I. Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem Pharmacol* 71: 551-64, 2006.
16. Bloom D, Dhakshinamoorthy S, Jaiswal AK. Site-directed mutagenesis of cysteine to serine in the DNA binding region of Nrf2 decreases its capacity to upregulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Oncogene* 21: 2191-200, 2002.
17. Blouin J-M, Chaves VE, Bortoli S, Forest C. Effet des acides gras sur l'inflammation et le cancer. *OCL* 13 6, 2006.
18. Brodlie M, McKean MC, Johnson GE, Anderson AE, Hilkens CMU, Fisher AJ, Corris PA, Lordan JL, Ward C. Raised interleukin-17 is immunolocalised to neutrophils in cystic fibrosis lung disease. *European Respiratory Journal* 37: 1378-85, 2011.
19. Brosnan JT, Brosnan ME. The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. *The*

- journal of nutrition* 136 (6suppl): 5, 2006.
20. Cantin AM, White TB, Cross CE, Forman HJ, Sokol RJ, Borowitz D. Antioxidants in cystic fibrosis. Conclusions from the CF antioxidant workshop, Bethesda, Maryland, November 11-12, 2003. *Free Radic Biol Med* 42: 15-31, 2007.
 21. Caro AA, Cederbaum AI. Role of intracellular calcium and phospholipase A2 in arachidonic acid-induced toxicity in liver cells overexpressing CYP2E1. *Arch Biochem Biophys* 457: 252-63, 2007.
 22. Chan SW, Chevalier S, Aprikian A, Chen JZ. Simultaneous quantification of mitochondrial DNA damage and copy number in circulating blood: a sensitive approach to systemic oxidative stress. *Biomed Res Int* 2013: 157547, 2013.
 23. Chanson M. mucoviscidose, déséquilibre en acides gras, céramides et radeaux membranaires. *Archives de pédiatrie* 16: 543-545, 2009.
 24. Chen J, Kinter M, Shank S, Cotton C, Kelley TJ, Ziady AG. Dysfunction of Nrf-2 in CF epithelia leads to excess intracellular H₂O₂ and inflammatory cytokine production. *PLoS ONE [Electronic Resource]* 3: e3367, 2008.
 25. 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* 68: 12, 2007.
 26. Chu FF, Esworthy RS, Doroshov JH. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med* 36: 1481-95, 2004.
 27. Cillard J, Cillard P. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 13: 24-29, 2006.
 28. Circu ML, Aw TY. Glutathione and apoptosis. *Free Radic Res* 42: 689-706, 2008.
 29. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48: 749-62, 2010.
 30. Circu ML, Aw TY. Redox biology of the intestine. *Free Radic Res* 45: 1245-66, 2011.
 31. Circu ML, Aw TY. Intestinal redox biology and oxidative stress. *Semin Cell Dev Biol* 23: 729-37, 2012.
 32. Conrad M, Schick J, Angeli JP. Glutathione and thioredoxin dependent systems in neurodegenerative disease: what can be learned from reverse genetics in mice. *Neurochem Int* 62: 738-49, 2013.
 33. Cornelius N, Byron C, Hargreaves I, Guerra PF, Furdek AK, Land J, Radford WW, Frerman F, Corydon TJ, Gregersen N, Olsen RK. Secondary coenzyme Q10 deficiency and oxidative stress in cultured fibroblasts from patients with riboflavin responsive multiple Acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Hum Mol Genet* 22: 3819-27, 2013.
 34. Coste TC, Deumer G, Reyhler G, Lebecque P, Wallemacq P, Leal T. Influence of pancreatic status and sex on polyunsaturated fatty acid profiles in cystic fibrosis. *Clin Chem* 54: 388-95, 2008.
 35. Dahm LJ, Jones DP. Secretion of cysteine and glutathione from mucosa to lumen in rat small intestine. *American Journal of Physiology* 267: G292-300, 1994.
 36. Dahm LJ, Jones DP. Rat jejunum controls luminal thiol-disulfide redox. *Journal of Nutrition* 130: 2739-45, 2000.
 37. Day BJ, van Heeckeren AM, Min E, Velsor LW. Role for Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein in a Glutathione Response to Bronchopulmonary Pseudomonas Infection. *Infection and Immunity* 72: 2045-2051, 2004.
 38. Dehecchi MC, Girella E, Cabrini G, Berton G. The km of NADH deshydrogenase is decreased in mitochondria of cystic-fibrosis cells *Enzyme* 40: 45-50, 1988.
 39. Dixon BM, Heath SH, Kim R, Suh JH, Hagen TM. Assessment of endoplasmic

- reticulum glutathione redox status is confounded by extensive ex vivo oxidation. *Antioxidants & Redox Signaling* 10: 963-72, 2008.
40. Dorsey J, Buckley D, Summer S, Jandacek RJ, Rider T, Tso P, Narkewicz MR, Heubi JE. Fat malabsorption in cystic fibrosis: comparison of quantitative fat assay and a novel assay using fecal lauric/behenic acid. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 50: 441-6, 2010.
 41. Douki T, Odin F, Caillat S, Favier A, Cadet J. Predominance of the 1,N2-propano 2'-deoxyguanosine adduct among 4-hydroxy-2-nonenal-induced DNA lesions. *Free Radic Biol Med* 37: 62-70, 2004.
 42. Drose S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol* 748: 145-69, 2012.
 43. Durieu I, Abbas-Chorfa F, Draï J, Iwaz J, Steghens JP, Puget M, Ecochard R, Bellon G. Plasma fatty acids and lipid hydroperoxides increase after antibiotic therapy in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal* 29: 958-64, 2007.
 44. Durieu I, Josserand RN. Cystic fibrosis in 2008. *Rev Med Interne* 29: 901-7, 2008.
 45. Favier A. Le stress oxydant. *L'actualité chimique*: 108-115, 2003.
 46. Fernandes AP, Holmgren A. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants & Redox Signaling* 6: 63-74, 2004.
 47. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochemical Pharmacology* 64: 8, 2002.
 48. Fischer H. Mechanisms and function of DUOX in epithelia of the lung. *Antioxidants & Redox Signaling* 11: 2453-65, 2009.
 49. Freedman SD, Blanco GP, Zaman MM, Shea JC, Ollero M, Hopper KI, Weed DA, Gelrud A, Regan MM, Laposata M, Alvarez JG, B.P. OS. Association of Cystic Fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *The new england journal of medicine and Health* 350: 10, 2004.
 50. Freedman SD, Weinstein D, Blanco PG, Martinez-Clark P, Urman S, Zaman M, Morrow JD, Alvarez JG. Characterization of LPS-induced lung inflammation in *cftr*^{-/-} mice and the effect of docosahexaenoic acid. *J Appl Physiol* 92: 2169-76, 2002.
 51. Fujimori N, Oono T, Igarashi H, Ito T, Nakamura T, Uchida M, Coy DH, Jensen RT, Takayanagi R. Vasoactive intestinal peptide reduces oxidative stress in pancreatic acinar cells through the inhibition of NADPH oxidase. *Peptides* 32: 2067-76, 2011.
 52. Galli F, Battistoni A, Gambari R, Pompella A, Bragonzi A, Pilolli F, Iuliano L, Piroddi M, Dehecchi MC, Cabrini G, Working Group on Inflammation in Cystic F. Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 1822: 690-713, 2012.
 53. Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *Journal of Gastroenterology & Hepatology* 21 Suppl 3: S3-6, 2006.
 54. Garrel C, Ceballos-Picot I, Germain G, Al-Gubory KH. Oxidative stress-inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F₂α-induced luteal cell death in vivo. *Free Radic Res* 41: 251-9, 2007.
 55. Ghelli A, Tropeano CV, Calvaruso MA, Marchesini A, Iommarini L, Porcelli AM, Zanna C, De Nardo V, Martinuzzi A, Wibrand F, Vissing J, Kurelac I, Gasparre G, Selamoglu N, Daldal F, Rugolo M. The cytochrome b p.278Y>C mutation causative of a multisystem disorder enhances superoxide production and alters supramolecular interactions of respiratory chain complexes. *Hum Mol Genet* 22: 2141-51, 2013.
 56. Go YM, Jones DP. Intracellular proatherogenic events and cell adhesion modulated by extracellular thiol/disulfide redox state. *Circulation* 111: 2973-80, 2005.

57. Go YM, Jones DP. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780: 1273-90, 2008.
58. Godoy JR, Funke M, Ackermann W, Haunhorst P, Oesteritz S, Capani F, Elsasser HP, Lillig CH. Redox atlas of the mouse. Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse. *Biochimica et Biophysica Acta* 1810: 2-92, 2011.
59. Grant CM. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology* 39(3): 9, 2001.
60. Grasemann H, Ioannidis I, Tomkiewicz RP, De Groot H, Rubin BK, Ratjen F. Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease. *Archives of Disease in Childhood* 78: 49-53, 1998.
61. Grasemann H, Michler E, Wallot M, Ratjen F. Decreased concentration of exhaled nitric oxide (NO) in patients with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 24: 173-7, 1997.
62. Hakim F, Kerem E, Rivlin J, Bentur L, Stankiewicz H, Bdolach-Abram T, Wilschanski M. Vitamins A and E and Pulmonary Exacerbations in Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 45: 7, 2007.
63. Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP. Le stress oxydant. *Rev Med Liege* 6210: 628, 2007.
64. Han D, Canali R, Rettori D, Kaplowitz N. Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Molecular Pharmacology* 64: 1136-44, 2003.
65. Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochemical journal* 53: 6, 2001.
66. Han Y, Chen JZ. Oxidative stress induces mitochondrial DNA damage and cytotoxicity through independent mechanisms in human cancer cells. *Biomed Res Int* 2013: 825065, 2013.
67. Hansen JM, Go YM, Jones DP. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* 46: 215-34, 2006.
68. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? . *Free Radic Biol Med* 33: 23, 2002.
69. Haunhorst P, Berndt C, Eitner S, Godoy JR, Lillig CH. Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein. *Biochem Biophys Res Commun* 394: 372-6, 2010.
70. Himmelfarb J, Mcmonagle E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney International* 60: 6, 2001.
71. Hirst J. Towards the molecular mechanism of respiratory complex I. *Biochem J* 425: 327-39, 2010.
72. Hirst J. Why does mitochondrial complex I have so many subunits? *Biochem J* 437: e1-3, 2011.
73. Huang SH, Schall JI, Zemel BS, Stallings VA. Vitamin E status in children with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency. *Journal of Pediatrics* 148: 556-559, 2006.
74. Hudson VM. Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation. *Free Radical Biology & Medicine* 30: 1440-61, 2001.
75. Hudson VM. New insights into the pathogenesis of cystic fibrosis: pivotal role of glutathione system dysfunction and implications for therapy. *Treatments in Respiratory Medicine* 3: 353-63, 2004.

76. Ikuma M, Welsh MJ. Regulation of CFTR Cl⁻ channel gating by ATP binding and hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8675-80, 2000.
77. Iuliano L, Monticolo R, Straface G, Zullo S, Galli F, Boaz M, Quattrucci S. Association of cholesterol oxidation and abnormalities in fatty acid metabolism in cystic fibrosis. *American Journal of Clinical Nutrition* 90: 477-84, 2009.
78. Iyer SS. Cysteine/cystine redox state in lung injury and fibrosis. USA: Purdue; 2003. 234 p.
79. Jacob C, Knight I, Winyard PG. Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. *Biol Chem* 387: 1385-97, 2006.
80. Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods in Enzymology* 348: 93-112, 2002.
81. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxidants and redox signaling* 8: 14, 2006.
82. Jones DP, Go YM. Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes, Obesity & Metabolism* 12 Suppl 2: 116-25, 2010.
83. Kehrer JP. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149: 8, 2000.
84. Kelly-Aubert M, Trudel S, Fritsch J, Nguyen-Khoa T, Baudouin-Legros M, Moriceau S, Jeanson L, Djouadi F, Matar C, Conti M, Ollero M, Brouillard F, Edelman A. GSH monoethyl ester rescues mitochondrial defects in cystic fibrosis models. *Hum Mol Genet* 20: 2745-59, 2011.
85. Kemp M, Go YM, Jones DP. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radical Biology & Medicine* 44: 921-37, 2008.
86. Kettle AJ, Chan T, Osberg I, Senthilmohan R, Chapman AL, Mocatta TJ, Wagener JS. Myeloperoxidase and protein oxidation in the airways of young children with cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine* 170: 1317-23, 2004.
87. Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P) oxidation-reduction state. *Biochemistry Journal* 368: 9, 2002.
88. Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7607-12, 2006.
89. Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 22: 193-201, 2007.
90. Lands LC, Grey VL, Grenier C. Total Plasma Antioxidant Capacity in Cystic Fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 29:81–87 29: 7, 2000.
91. Larrey D. Pathologies hépatiques mitochondriales pdf. *Gastroentérologie clinique et biologique* 25: B117-B122, 2001.
92. Lee IT, Yang CM. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochem Pharmacol* 84: 581-90, 2012.
93. Lee SH, Arora JA, Oe T, Blair IA. 4-Hydroperoxy-2-nonenal-Induced formation of,N2-Etheno-2'-deoxyguanosine Adducts1. *Chemical Research in Toxicology* 18: 7, 2005.
94. Lenoir G, Sermet I, Duhamel J-F. La mucoviscidose en 2001: le dépistage et la pharmacologie du CFTR. *Journal de pédiatrie et de puériculture* 7: 437-443, 2001.
95. Leschelle X, Gubern M, Andriamihaja M, Blottiere HM, Couplan E, Gonzalez-Barroso MD, Petit C, Pagniez A, Chaumontet C, Mignotte B, Bouillaud F, Blachier F. Adaptive metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects

- of the luminal compound sulfide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1725: 201-12, 2005.
96. Levy E, Lepage G, Bendayan M, Ronco N, Thibault L, Galiano N, Smith L, Roy CC. Relationship of decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities to essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients. *Journal of Lipid Research* 30: 13, 1989.
 97. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry* 80: 780-7, 2002.
 98. Lonlay Pd, Djouadi F, Bonnefont JP, Saudubray JM, Bastin J. La Bêta-oxydation mitochondriale des acides gras : une voie métabolique essentielle du fonctionnement musculaire. *Archives pédiatriques* 9: 4, 2002.
 99. Lutgendorff F, Trulsson LM, Van Minnen LP, Rijkers GT, Timmerman HM, Franzen LE, Gooszen HG, Akkermans LMA, Soderholm JD, Sandstrom PA. Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology* 295: G1111-21, 2008.
 100. Mackenzie J, Pedersen L, Arent S, Henriksen A. Controlling electron transfer in Acyl-CoA oxidases and dehydrogenases: a structural view. *J Biol Chem* 281: 31012-20, 2006.
 101. Madan JC, Koestler DC, Stanton BA, Davidson L, Moulton LA, Housman ML, Moore JH, Guill MF, Morrison HG, Sogin ML, Hampton TH, Karagas MR, Palumbo PE, Foster JA, Hibberd PL, O'Toole GA. Serial analysis of the gut and respiratory microbiome in cystic fibrosis in infancy: interaction between intestinal and respiratory tracts and impact of nutritional exposures. *MBio* 3, 2012.
 102. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal* 9: 2277-93, 2007.
 103. Mari M, Morales A, Colell A, ia-Ruiz CG, ndez-Checa JCF. Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant. *Antioxidants & Redox Signaling* 11: 16, 2009.
 104. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 16: 577-86, 2005.
 105. Medjane S, Raymond B, Wu Y, Touqui L. Impact of CFTR DeltaF508 mutation on prostaglandin E2 production and type IIA phospholipase A2 expression by pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L816-24, 2005.
 106. Meyerholz DK, Stoltz DA, Pezzulo AA, Welsh MJ. Pathology of gastrointestinal organs in a porcine model of cystic fibrosis. *Am J Pathol* 176: 1377-89, 2010.
 107. Mimoun M, Coste TC, Lebacq J, Lebecque P, Wallemacq P, Leal T, Armand M. Increased tissue arachidonic acid and reduced linoleic acid in a mouse model of cystic fibrosis are reversed by supplemental glycerophospholipids enriched in docosahexaenoic acid. *Journal of Nutrition* 139: 2358-64, 2009.
 108. Miz-Echevarri´A LA, Prieto JA, Andrade F, Elorz J, Sojo A, Lage S, Sanjurjo P, Va´zquez C, Rodri´Guez-Soriano J. Persistence of Essential Fatty Acid Deficiency in Cystic Fibrosis despite Nutritional Therapy. *Pediatric Research* 66: 5, 2009.
 109. Morel Y, Barouki R. Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *médecine/sciences* 14: 9, 1998.
 110. Moriarty-Craige SE, Jones DP. Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annual Review of Nutrition* 24: 481-509, 2004.
 111. Mouterde O. Manifestations digestives et nutritionnelles de la mucoviscidose. *Revue francophone des laboratoires* 397: 43-47, 2007.
 112. Munck A. Atteinte digestive de la mucoviscidose chez l'enfant *Médecine*

- Thérapeutique Pédiatrie* 8: 197-203, 2005.
113. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417: 1-13, 2009.
 114. Naruse S. cystic fibrosis and related diseases of the pancreas *Best practice and Research. Clinical gastroenterology* 16 numéro 3: 511-526, 2002.
 115. Negre-Salvayre A, Salvayre R. Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : Implication en physiopathologie vasculaire. *OCL* 12: 6, 2005.
 116. Njoroge SW, Laposata M, Katrangi W, Seegmiller AC. DHA and EPA reverse cystic fibrosis-related FA abnormalities by suppressing FA desaturase expression and activity. *J Lipid Res* 53: 257-65, 2012.
 117. Nzungue Y. Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53. Grenoble, France: Joseph Fournier; 2008. 299 p.
 118. Ortona E, Margutti P, Matarrese P, Franconi F, Malorni W. Redox state, cell death and autoimmune diseases: a gender perspective. *Autoimmun Rev* 7: 579-84, 2008.
 119. Oudshoorn JH, Lecluse ALY, Berg Rvd, Wouter H.J. Vaes, Laag Jvd, Houwen RHJ. Decreased Coenzyme Q10 Concentration in Plasma of Children with Cystic Fibrosis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 43: 5, 2006.
 120. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta* 333: 19-39, 2003.
 121. Peretti N, Roy CC, Drouin E, Seidman E, P. B, Casimir G, Levy E. Abnormal intracellular lipid processing contributes to fat malabsorption in cystic fibrosis patients. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology* 290: 7, 2005.
 122. Perevoshchikova IV, Quinlan CL, Orr AL, Gerencser AA, Brand MD. Sites of superoxide and hydrogen peroxide production during fatty acid oxidation in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radic Biol Med* 61C: 298-309, 2013.
 123. Perricone C, De Carolis C, Perricone R. Glutathione: a key player in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 8: 697-701, 2009.
 124. Petrov MS. Therapeutic implications of oxidative stress in acute and chronic pancreatitis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 13: 562-8, 2010.
 125. Pilewski J, frizzell R. the cftr in airways disease.pdf. *Physiological Review* 79: S215-S252, 1999.
 126. Ramirez A, Ramadan B, Ritzenthaler JD, Rivera HN, Jones DP, Roman J. Extracellular cysteine/cystine redox potential controls lung fibroblast proliferation and matrix expression through upregulation of transforming growth factor-beta. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L972-81, 2007.
 127. Ramsay RR, Steenkamp DJ, Husain M. Reactions of electron-transfer flavoprotein and electron-transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase. *Biochemistry journal* 241: 10, 1987.
 128. Ravilly S, Roux EL, bellis G, Dufour F. Epidémiologie et physiopathologie de la mucoviscidose. *Revue francophone des laboratoires* 397: 26-36, 2007.
 129. Ricquier D, Bouillaud F. Protéines découplantes mitochondriales. *médecine/sciences* 14: 9, 1998.
 130. Rosca MG, Vazquez EJ, Chen Q, Kerner J, Kern TS, Hoppel CL. Oxidation of fatty acids is the source of increased mitochondrial reactive oxygen species production in kidney cortical tubules in early diabetes. *Diabetes* 61: 2074-83, 2012.
 131. Rottner M, Freyssinet JM, Martinez MC. Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. *Respir Res* 10: 23, 2009.
 132. Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG. Systemic deficiency of

- glutathione in cystic fibrosis. *Journal of Applied Physiology* 75: 2419-24, 1993.
133. Ruzicka FJ, Beinert H. [OBS]A New Iron-Sulfur Flavoprotein of the Respiratory chain a component of the fatty acid /3 oxidation pathway. *the journal of biological chemistry* 252: 6.
 134. Sagel SD, Sontag MK, Anthony MM, Emmett P, Papas KA. Effect of an antioxidant-rich multivitamin supplement in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 10: 31-6, 2011.
 135. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine* 30: 1191-212, 2001.
 136. Scheffler IE. *Mitochondria*. San Diego, CA: John Wiley and sons, INC.; 2007. 484 p.
 137. Schonfeld P, Wojtczak L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 45: 231-41, 2008.
 138. Schroeder BO, Wu Z, Nuding S, Groscurth S, Marcinowski M, Beisner J, Buchner J, Schaller M, Stange EF, Wehkamp J. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. *Nature* 469: 419-23, 2011.
 139. Shapiro BL, Lam LFH, Feigal RJ. Mitochondrial NADH Dehydrogenase in Cystic Fibrosis: Enzyme Kinetics in Cultured Fibroblasts. *American Journal of Human Genetics* 34: 7, 1982.
 140. Starosta V, Rietschel E, Paul K, Baumann U, Griese M. Oxidative changes of bronchoalveolar proteins in cystic fibrosis. *Chest* 129: 431-7, 2006.
 141. Steenkamp DJ. Cross-linking of the electron-transfer flavoprotein to electron-transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase with heterobifunctional reagents. *Biochemistry journal* 255: 8, 1988.
 142. Storni V, Claustres M, Chinest T, Ravilly S. Diagnostic de la mucoviscidose. *Archives pédiatriques* 818-832, 2001.
 143. Strandvik B. Fatty acid metabolism in cystic fibrosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 83: 121-9, 2010.
 144. Strandvik B, Gronowitz E, Enlund F, Martinsson T, Wahlstrom J. Essential fatty acid deficiency in relation to genotype in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 139: 650-5, 2001.
 145. Sudheesh NP, Ajith TA, Janardhanan KK. Hepatoprotective effects of DL-alpha-lipoic acid and alpha-Tocopherol through amelioration of the mitochondrial oxidative stress in acetaminophen challenged rats. *Toxicol Mech Methods* 23: 368-76, 2013.
 146. Taha R, Seidman E, Mailhot G, Boudreau F, Gendron FP, Beaulieu JF, Menard D, Delvin E, Amre D, Levy E. Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 cell line. *PLoS One* 5: e11817, 2010.
 147. Tirouvanziam R, Conrad CK, Bottiglieri T, Herzenberg LA, Moss RB, Herzenberg LA. High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 4628-33, 2006.
 148. Treberg JR, Quinlan CL, Brand MD. Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* 286: 27103-10, 2011.
 149. Valdivieso AG, Clazure M, Marin MC, Taminelli GL, Massip Copiz MM, Sanchez F, Schulman G, Teiber ML, Santa-Coloma TA. The mitochondrial complex I activity is reduced in cells with impaired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) function. *PLoS One* 7: e48059, 2012.
 150. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84, 2007.

151. Van Biervliet S, Van Biervliet JP, Robberecht E, Christophe A. Fatty acid composition of serum phospholipids in cystic fibrosis (CF) patients with or without CF related liver disease. *Clin Chem Lab Med* 48: 1751-5, 2010.
152. Velsor LW, Kariya C, Kachadourian R, Day BJ. Mitochondrial oxidative stress in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35: 579-86, 2006.
153. Verhaege C. Etude des mécanismes moléculaires responsables d'un état inflammatoire intrinsèque dans la mucoviscidose. Liège: Université de Liège; 2007. 112 p.
154. Watmough NJ, Frerman FE. The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1910-6, 2010.
155. Wine JJ. Cystic fibrosis: The 'bicarbonate before chloride' hypothesis. *Current Biology* 11: 4, 2001.
156. Winklhofer-Roob BM, Puhl H, Khoschsorur G, Van't Hof MA, Ester-Bauer H, Shmerling DH. Enhanced resistance to oxidation of low density lipoproteins and decreased lipid peroxide formation during bêta-carotene supplementation in cystic fibrosis *Free Radical Biology & Medicine* 18: 11, 1995.
157. Winklhofer-Roob BM, Rock E, Ribalta J, Shmerling DH, Roob JM. Effects of vitamin E and carotenoid status on oxidative stress in health and disease. Evidence obtained from human intervention studies. *Molecular Aspects of Medicine* 24: 391-402, 2003.
158. Wood LG, Fitzgerald DA, Garg ML. Hypothesis: Vitamin E Complements Polyunsaturated Fatty Acids in Essential Fatty Acid Deficiency in Cystic Fibrosis. *Journal of the American College of Nutrition* 22: 5, 2003.
159. Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Collins CE, Garg ML. Oxidative Stress in Cystic Fibrosis: Dietary and Metabolic Factors. *Journal of the American College of Nutrition* 20: 9, 2001.
160. Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Garg ML. Increased plasma fatty acid concentrations after respiratory exacerbations are associated with elevated oxidative stress in cystic fibrosis patients.[Erratum appears in *Am J Clin Nutr* 2002 Oct;76(4):907]. *American Journal of Clinical Nutrition* 75: 668-75, 2002.
161. Wood LG, Fitzgerald DA, Lee AK, Garg ML. Improved antioxidant and fatty acid status of patients with cystic fibrosis after antioxidant supplementation is linked to improved lung function. *American Journal of Clinical Nutrition* 77: 10, 2003.

Figure 1

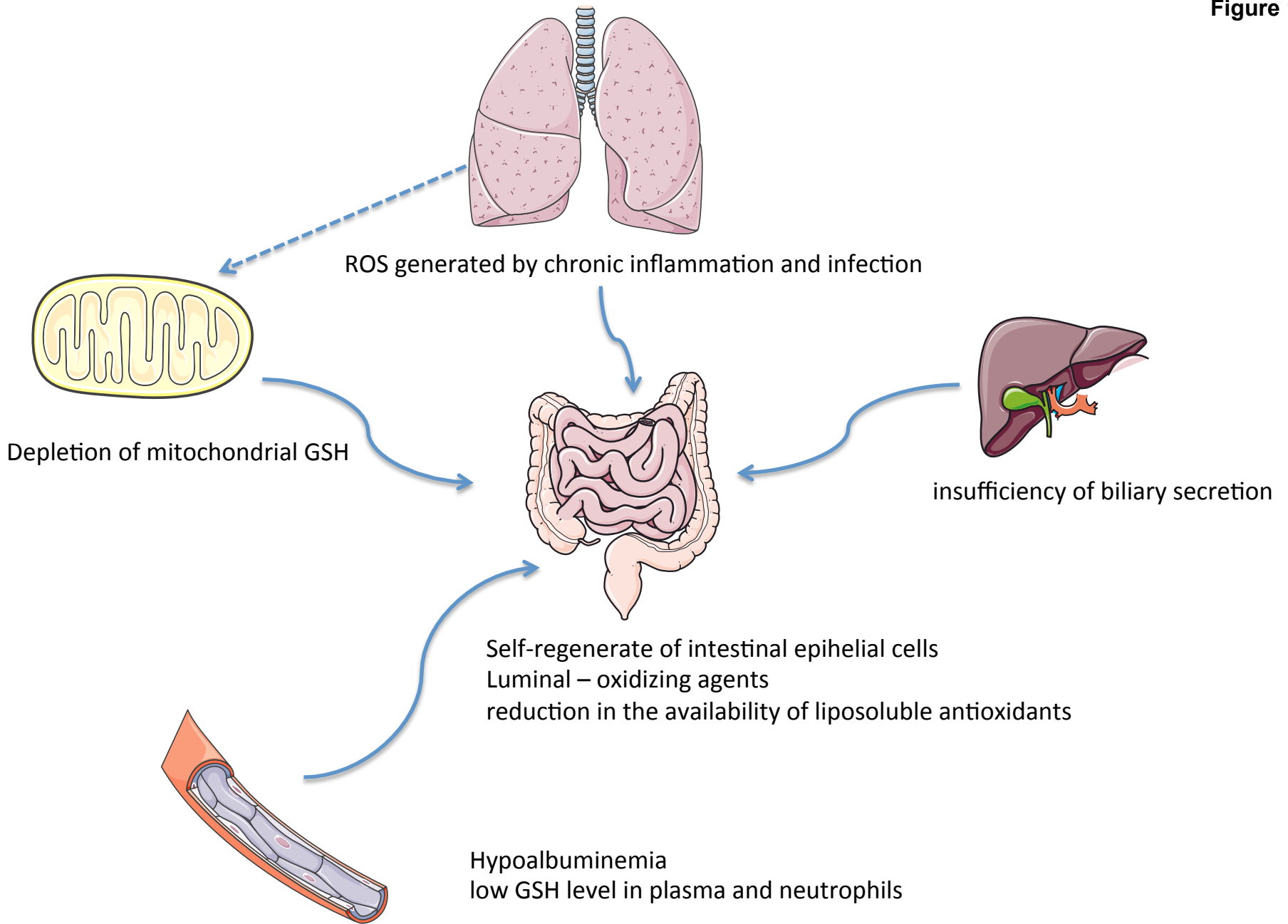


Figure 2

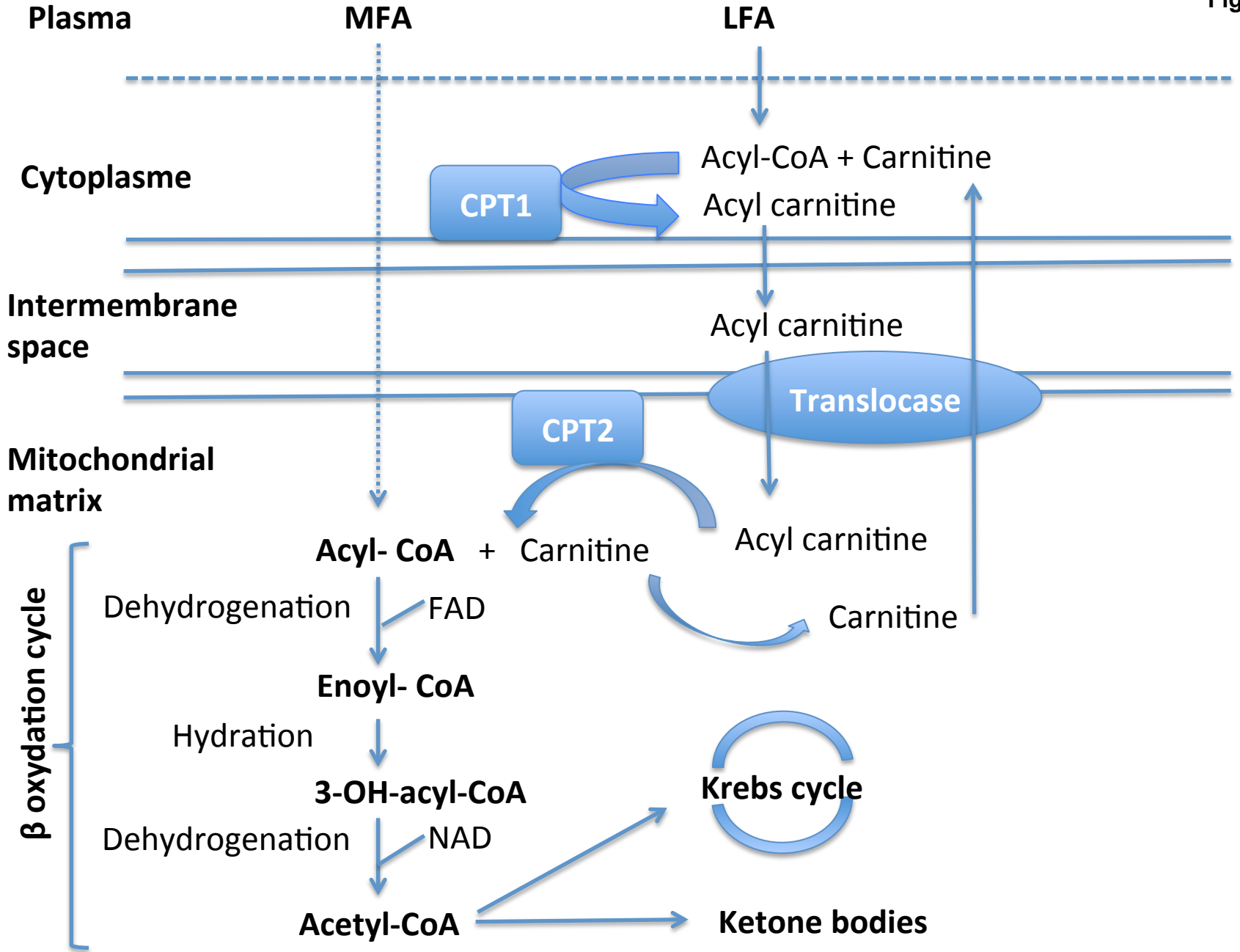
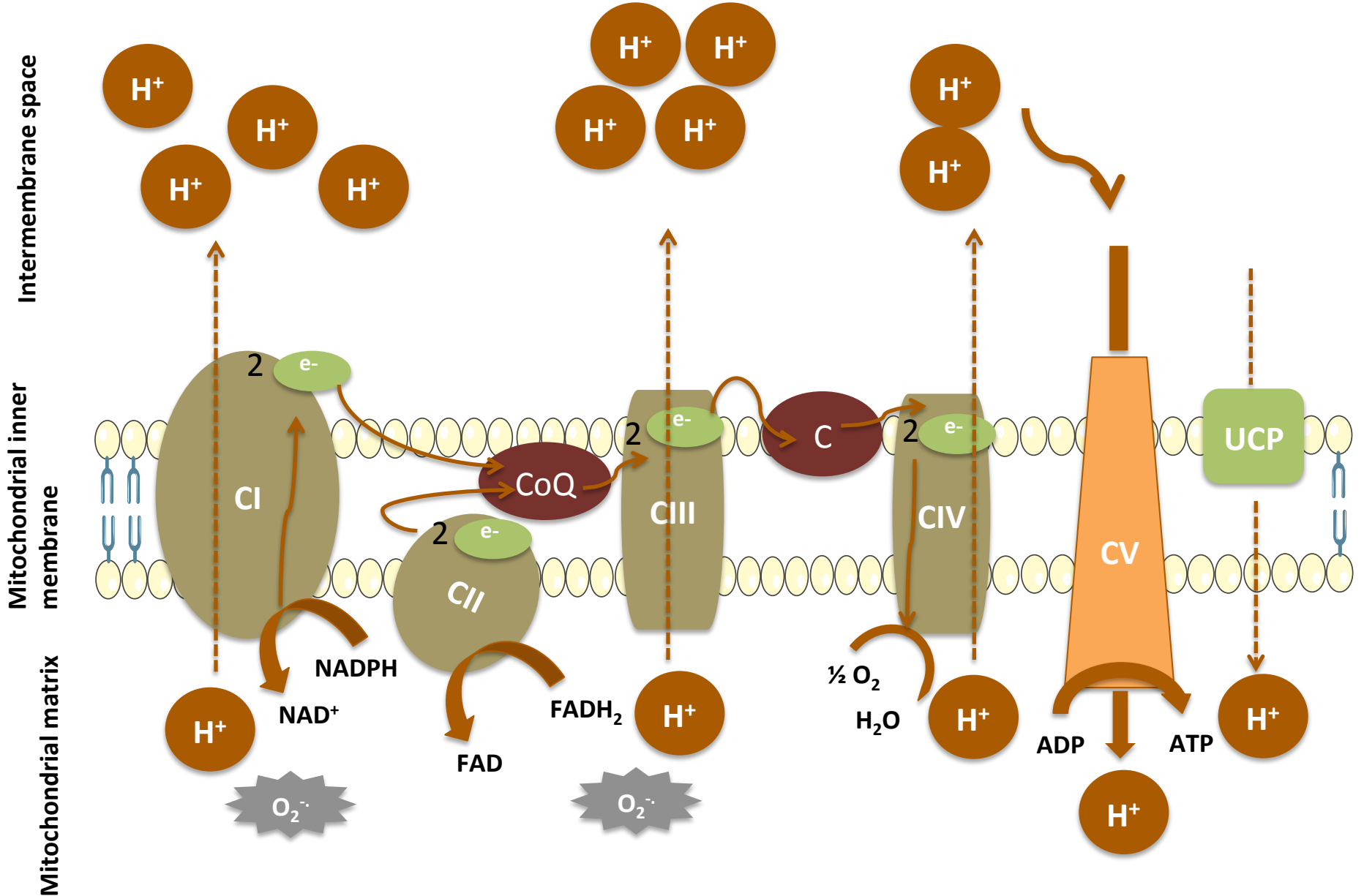


Figure 3



Article 2

Targeted CFTR gene disruption with Zinc-finger nucleases in human intestinal epithelial cells induces oxidative stress and inflammation

Marie-Laure Kleme,^{1,2} Alain Théophile Sane,¹ Carole Garofalo,¹ and Emile Levy^{1,2}

¹ Research Centre, CHU Sainte-Justine, 3175 Sainte-Catherine Road, Montreal, Quebec, Canada H3T 1C4 and ² Department of Nutrition, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5

Running Head: Cystic fibrosis: a direct link between oxidative stress and inflammation

Correspondence: Dr Emile Levy, GI-Nutrition Unit, Research Centre, CHU Sainte-Justine, 3175 Sainte-Catherine Road, Montreal, Quebec, Canada H3T 1C4, Telephone: +1 (514) 345-7783; Fax: +1 (514) 345-4999; email: emile.levy@recherche-ste-justine.qc.ca

ABBREVIATIONS

CAT: Catalase, CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, Fe/Asc: Iron-ascorbate complex, GI: Gastrointestinal, GPx: Glutathione peroxidase, GSH: Glutathione, MDA: Malondialdehyde, OxS: Oxidative stress, SOD: Superoxide dismutase, ZFN: Zinc Finger Nuclease

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is a multisystemic pathology caused by mutations of the *CF transmembrane conductance regulator (CFTR)* gene. **Objectives.** As the intestine harbors the greatest number of CFTR transcripts after birth and since CFTR plays a role in glutathione transport, we hypothesized that CFTR deletion might produce oxidative stress (OxS) and inflammation in CF intestinal epithelial cell. **Methods.** *CFTR* gene was abrogated in Caco-2/15 enterocytes through the zinc-finger nuclease system. Their oxidative and inflammatory characteristics were appreciated under basal conditions and after the treatment with the pro-oxidant iron-ascorbate (Fe/Asc) complex and pro-inflammatory lipopolysaccharide (LPS). **Results.** Intestinal epithelial cells with CFTR knockout spontaneously exhibited an increased lipid peroxidation level, reflected by malondialdehyde overproduction and reduced antioxidant defense characterized by low enzymatic activities of glutathione peroxidase and catalase. CFTR silencing also resulted in elevated protein expression of pro-inflammatory tumor necrosis Factor- α , interleukin-6, cyclooxygenase-2, and the transcription factor nuclear factor- κ B. Moreover, exaggerated OxS and inflammation processes occurred in CFTR^{-/-} cells in response to the addition of Fe/Asc and LPS, respectively. **Conclusions.** Intestinal Caco-2/15 cells with *CFTR* deletion, display innate oxidative and inflammatory features while being more sensitive to pro-oxidant and pro-inflammatory stimuli. These two pathophysiological processes could be implicated in CF-related intestinal disorders.

Keywords: Cystic Fibrosis, small intestine, oxidative stress, inflammation

1 INTRODUCTION

Cystic Fibrosis (CF) is the most lethal genetic disease in Caucasians (Ravilly *et al.*, 2007). It is due to mutations of the *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)* gene, which is located on the long arm of chromosome 7. The CFTR protein is a chloride channel expressed at the apical pole of all epithelial exocrine cells. At this level, it plays an essential role in the regulation of fluid secretion by interacting with other channels involved in sodium, chloride and potassium transport (Storni *et al.*, 2001). In addition, the CFTR protein also transports glutathione (GSH), bicarbonate, acetate and formate (Wine, 2001; Naruse, 2002). With its C-terminal extremity, CFTR interacts with proteins involved in its refolding, its transit between Golgi apparatus and apical membrane, and its stability at the apical pole (Guggino, 2004; Wang *et al.*, 2006). Moreover, CFTR is implicated in various cellular processes such as endocytosis, exocytosis and acidification of cytoplasmic vesicles (Bradbury *et al.*, 1992). It also constitutes a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide (LPS) (Pier, 2002). In fact, CFTR recognizes *Pseudomonas aeruginosa* LPS and allows its internalization in epithelial cells, resulting in the nuclear translocation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B). CFTR defects lead to multiple disorders, including chronic respiratory failure and exocrine pancreatic insufficiency (Durieu and Josserand, 2008; Chanson, 2009), as well as lipid and lipophilic vitamin intestinal malabsorption (Munck, 2005; Mouterde, 2007; Strandvik, 2010) and essential fatty acid deficiency (Levy *et al.*, 1989; Dorsey *et al.*, 2010). Even though CF is defined as a single gene disorder, its wide-ranging manifestations suggest diverse physiological roles for the CFTR protein.

The pathophysiology of CF is complex and many hypotheses have been proposed to explain its mechanisms, including inflammation and oxidative stress (OxS). Inflammation has been described especially in airways. The impairment of chloride secretion by defective or dysfunctional CFTR leads to bacterial colonisation of the lung in association with neutrophil infiltration and inflammation as a consequence of excessive reabsorption of sodium and water, reduction of airway surface liquid volume, and impairment of mucociliary clearance (Cantin *et al.*, 2007). Even if many studies report massive infiltration of neutrophils and the presence of inflammatory cytokines in CF patients' airways (Wood *et al.*, 2001), inflammation occurs in the earliest stages of lung damage, often before bacterial infection and before symptoms occur (Verhaeghe, 2007), thereby suggesting that CFTR defects are likely to directly contribute to the inflammatory process. In this context, arachidonic acid serves as a substrate for inflammation derivatives and reactive oxygen species production (Caro and Cederbaum, 2007; Rottner *et al.*, 2009), which may contribute to the oxidant/antioxidant imbalance, a key parameter in CF lung pathology, closely related to the low content of GSH in airways (Day *et al.*, 2004). Although OxS is generally related to the inefficient absorption of fat-soluble vitamins in CF, *CFTR* loss or aberration has been proposed to directly affect the intracellular redox status in CF lungs (Chen *et al.*, 2008; Kelly *et al.*, 2010)

Although the gut possesses the greatest number of *CFTR* transcripts after birth (Storni *et al.*, 2001), little attention has been devoted to the investigation of the inflammatory and oxidative status in CF intestinal epithelial cells. However, severe clinical gastrointestinal (GI) signs

characterize CF patients, including chronic diarrhea, fat malabsorption, reduced secretion of sodium bicarbonate, low duodenal pH and bile acid precipitation (Reis and Damaceno, 1998). Among other events related to GI disorders in CF, there are meconium ileus (occurring in approximately 20% of newborns) and the distal intestinal obstruction syndrome (in about 25% of CF adults) (Thomson *et al.*, 2012). Accumulation of viscous and sticky mucus, small intestinal bacterial overgrowth, ileal hypertrophy and villous atrophy, and augmented intestinal permeability may contribute to fat malabsorption, OxS and inflammation in CF patients (Van Elburg *et al.*, 1996; Lewindon *et al.*, 1998; Sbarbati *et al.*, 1998; Raia *et al.*, 2000; Smyth *et al.*, 2000; Bruzzese *et al.*, 2004; Quigley and Quera, 2006; Lisowska *et al.*, 2009) along with enterocyte dysfunctions (Levy *et al.*, 1992; Peretti *et al.*, 2005; Peretti *et al.*, 2006; Mailhot *et al.*, 2009; Mailhot *et al.*, 2010). In the CF mouse model, there is an upregulation of genes involved in inflammation, particularly those associated with innate immunity in the CF mouse intestine (Norkina *et al.*, 2004). An increment of mast cells and neutrophils is also recorded in numbers of mast cells and neutrophils in the small intestine of these mice (Bensalem *et al.*, 2005). Confirmation was obtained in the porcine CF model that displays inflammation, characterized by mild to moderate cellular infiltrates (Meyerholz *et al.*, 2010). Although these findings collectively indicate that OxS and inflammation are implicated in the pathophysiology of several disorders encountered in CF subjects, the direct contribution of CFTR was poorly investigated in the small intestine. Therefore, the major aim of this study was to determine whether the deletion of *CFTR* gene directly affects the pro-oxidant/antioxidant balance and spontaneously leads to inflammation. We used the zinc finger nuclease (ZFN) method to totally knockout *CFTR* in the Caco-2/15 cell line and to assess OxS and inflammation. These processes were evaluated under basal conditions and after the administration of oxidative or inflammatory inducers.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Generation of *CFTR* knockout Caco-2/15 cell line

Human epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2/15 cells is a stable clone of the parent Caco-2 cell line (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Intestinal Caco-2/15 cells were grown at 37°C with 95% humidity and 5% CO₂ in EMEM supplemented with 10% decompemented foetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin and 1% non-essential amino acids (NEAA, all reagents from GIBCO- BRL, Grand Island, NY) as described previously (Bernotti *et al.*, 2003; Levy *et al.*, 2007; Marcil *et al.*, 2010). At 95% of confluence, the cells were transfected with ZFN targeted to human *CFTR* gene (CKOZFN1722) according to the procedure provided by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). One plasmid construct harboured the ZFN targeting forward strand and the other the ZFN targeting reverse strand. These ZFNs bind to a specific locus on *CFTR* sequence and cause a double-strand break that is ultimately repaired in the cell by the process of non-homologous end joining to generate precisely targeted genomic edits resulting in cell lines with specific gene disruption. Forty-eight hour-post transfection, serial dilutions were carried out to isolate a clone with knocked out *CFTR*. The clone was then screened for *CFTR*

deletion through RT-PCR and Western blot assays. The knockout was verified before each experiment and untransfected Caco-2/15 cells were used as controls.

2.2 Integrity of Caco-2/15 cells

Cell integrity was monitored by assessment of villin protein expression and sucrase activity as markers of cell differentiation (Mailhot *et al.*, 2010; Precourt *et al.*, 2012). Sucrase activity was determined according to Lloyd and Whelan procedure. Cells were collected in maleate buffer (pH 6.0) Sucrose substrate and H₂O were added to aliquots of cell homogenates before 1 hour-incubation at 37°C. TGO (Tris buffer 0,3 M and phosphate 0,42 M, pH 7.4) and H₂O (300 ul) were subsequently added before a second 1 hour-incubation at 37°C. Hydrochloric acid (4 ml) was then added and sucrase absorbance was read at 525 nm wavelengths by spectrophotometry. Monolayer intactness and physical barrier function were tested by evaluating morphology, transepithelial electric resistance, and occludin protein expression (Escaffit *et al.*, 2006).

2.3 Cell culture and treatments

Control (CTL) and CFTR knockout (CFTR^{-/-}) Caco-2/15 cells were grown at 37°C, with 95% humidity and 5% CO₂, at a density of 1X10⁶/well, in a six-well plate containing 2 ml of MEM supplemented with 1% penicillin-streptomycin, 1% MEM NEAA and 5% decompemented foetal bovine serum. The medium was refreshed every third day. Fifteen days post confluence, when cells were highly differentiated and appropriate for experimental treatments, they were first washed with cold PBS and then incubated for 18-20h with serum free MEM supplemented with 1% penicillin-streptomycin and 1% MEM NEAA prior to specific treatments. The 6-hydroxy-2, 5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox, 250 µM) (SIGMA) was added to the medium to serve as an antioxidant under certain conditions.

2.4 Induction of OxS and inflammation

The OxS was induced by incubating differentiated intestinal Caco-2/15 (CTL and CFTR^{-/-}) cells with a mixture of 200 µM Iron (II) sulphate heptahydrate (F8633-250G) and 2 mM ascorbate (A5960-100G) for 6 hours at 37°C. Antioxidant effect was obtained by pre-incubating the cells with 250 µM Trolox followed by the treatment with iron/ascorbic acid (Fe/Asc) and Trolox for a 6 hour-incubation. Moreover, inflammation was induced by the addition of LPS (100 µg/ml, SIGMA) to cells for a 6 hour-incubation at 37°C.

2.5 RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was extracted from differentiated CTL and CFTR^{-/-} Caco-2/15 cells using QIAzol lysis reagent (Invitrogen) and reverse transcribed to generate cDNA. This was amplified by PCR using Taq polymerase (Feldan Bio, Quebec, QC, Canada) according to the manufacturer's instructions. *GAPDH* (as internal control) and *CFTR* primers are as follow: F-AGAAGGCTGGGGCTCATT and R-GGGCCATCCACAGTCTTCT; and F-

AGGAGGCAGTCTGTCCTGAA and R-CACTGCTGGTATGCTCTCCA, respectively. Amplicons were visualized on standard ethidium bromide-stained agarose gels. Fold change was calculated relatively to *GAPDH* and quantification was determined with the software UN-SCAN-IT gel 6.1.

2.6 Protein expression analysis by immunoblotting.

Caco-2/15 (CTL and CFTR^{-/-}) cells were harvested in mammalian protein extraction reagent (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, OJ190696) containing a mixture of antiproteases (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) after washing with cold PBS. The cells were then sonicated to ensure proper homogenization, and protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, USA). Protein samples (30 µg) were denatured during 10 min in a buffer containing SDS and mercaptoethanol. They were separated on a 7% or 12% SDS-polyacrylamide gel according to protein molecular weights and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Defatted milk proteins were used to block nonspecific sites of the membranes before adding primary antibodies: mouse anti human-villin (94 kDa, 1:2,000, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada); rabbit anti-occludin (59 kDa, 1:5,000, Abcam, Cambridge, MA); rabbit anti-CFTR (170 kDa, 1:1,000, Cell Signaling, Beverly, MA); goat anti-transcription factor nuclear factor kappa-B (NF-κB) p65 subunit (65 kDa, 1:10,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); rabbit anti- Inhibitor Kappa-B α (I-κBα) (39 kDa, 1:5,000; Cell Signaling, Beverly, MA), rabbit anti- Tumor necrosis Factor-α (TNF-α) (24 kDa, 1:5,000, Abcam, Cambridge, MA), rabbit anti- Interleukin-6 (IL-6) (25 kDa, 1:5,000, Novus biologicals), rabbit anti- Cyclooxygenase-2 (COX-2) (74 kDa, 1:1,000, Novus biologicals), mouse anti-β-actin (42 kDa, 1:250,000; Sigma). The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Expression of β-actin served as reference protein to confirm equal loading. Molecular size markers (BLUeye/PageRuler prestained protein ladder, Thermo scientific, Lithuania) were concomitantly loaded on gels. Blots were developed and the protein mass was quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and the UNSCAN- IT gel 6.1 software.

2.7 OxS assessment

The free malondialdehyde (MDA) released from Caco-2/15 (CTL and CFTR^{-/-}) cells on completion of Fe/Asc incubation was measured by HPLC with fluorescence detection (Denis *et al.*, 2013) to assess lipid peroxidation. The protein-free supernatants were obtained after protein precipitation with 10% sodium tungstate solution (Sigma) and reacted with an equivalent volume of 0.5% (wt/vol) thiobarbituric acid solution (TBA; Sigma, MO, USA) at 95°C for 60 min. After cooling to room temperature, the pink chromogene [(thiobarbituric acid) 2-MDA] was extracted with 1-butanol and dried over a stream of nitrogen at 37°C. The dry extract was then resuspended in potassium dihydrogen phosphate-methanol mobile phase (70:30, pH 7.0) before MDA determination.

2.8 Endogenous antioxidant enzyme activities

Differentiated CTL and CFTR^{-/-} Caco-2/15 cells were collected in a hypotonic lysis buffer (10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, and 0.2 mM PMSF) after washing with cold PBS. Regarding the activity assessment of Glutathione peroxidase (GPx), aliquots of cell homogenates were added to PBS buffer containing 10 mM GSH, 0.1 U glutathione reductase and 2 mM NADPH with 1.5% H₂O₂ to initiate the reaction. Absorbance was monitored every 30 s at 340 nm for 5 min (Precourt *et al.*, 2012). Total superoxide dismutase (SOD) activity was determined as described by McCord *et al.* (McCords and Fridovich, 1969). Briefly, superoxide radicals (O₂⁻) were generated by the addition of xanthine and xanthine oxidase, and oxidation of the SOD assay cocktail was followed at 550 nm for 5 min with a spectrophotometer. The same reaction was repeated with the addition of the sample and the SOD assay cocktail was less oxidized because of the SOD activity in the sample. Total SOD activity was then calculated.

The catalase (CAT) activity assay was adapted from the protocol reported by Jiang *et al.* (Jiang *et al.*, 1991) with measurement of xylenol orange oxidation at 560 nm in the presence of ferrous ions. Briefly, 100 μM H₂O₂ was added, and absorbance was monitored at 560 nm, which gave a reference value. Samples were then incubated on ice with the same H₂O₂ concentrations and allowed to react for 5 min. Because of the CAT activity in the sample, xylenol orange was less oxidized, since H₂O₂ had been hydrolyzed. CAT activity was then calculated using a standard curve.

2.9 Statistical analysis

All values are expressed as mean ± SEM of at least 3 different experiments done in triplicates. Data were analyzed by the two-tailed Student's *t* test or one-way ANOVA using PRISM 6.0 (GraphPad Software). The Difference were considered significant for *P* value < 0,05.

3 RESULTS

3.1 Validation of CFTR knockout in intestinal Caco-2/15 cells

The intestinal Caco-2/15 cells were transfected with ZFN targeted to human *CFTR* gene to generate a model of intestinal cells in which CFTR expression is completely deleted. At 15 days post confluence, CFTR expression was comparatively assessed in transfected and control untransfected cells (CTL). The semi-quantitative PCR revealed a total abrogation of *CFTR* gene in transfected cells compared to untransfected cells (Fig 1A). Accordingly, CFTR protein expression was totally deleted in transfected cells (CFTR^{-/-}) compared to CTL (Fig 1B). Noteworthy, the CFTR deletion obtained in this intestinal cellular line was stable over time. Thus, these cells were well suitable for investigating the role of CFTR in inflammation and OxS at the intestinal level.

3.2 CFTR^{-/-} cell integrity

The effects of *CFTR* total deletion on cells integrity were examined. The protein expression of villin and occludin (Fig 2A, 2B) were analyzed by Western blot and no significant

differences were observed between CFTR^{-/-} and CTL cells. Sucrase activity and Transepithelial electric resistance were also examined and once again the results in CFTR^{-/-} were not divergent from those of CTL cells (Fig 2C, 2D). These results indicate that the ZFN transfection technique and CFTR knockout do not exert cytotoxic effects on intestinal Caco-2/15 cell integrity.

3.3 Basal oxidative and antioxidant profiles of CFTR^{-/-} cells

To investigate OxS and antioxidant defense, we quantified MDA and endogenous enzyme activity of GPx, CAT and SOD in CFTR^{-/-} and CTL cells under basal conditions. CFTR^{-/-} cells presented a significant increase of MDA (185%) compared to CTL cells (100%), indicating an actual lipid peroxidation of 85% (Fig 3A). Concomitantly with MDA elevation, GPx and CAT activities were greatly reduced (Fig 3B, 3C) while total and mitochondrial SOD activities remained higher in CFTR^{-/-} than in CTL cells (Fig 3D, 3E) Therefore, these findings revealed an increase in MDA associated with an impaired antioxidant defense, which clearly demonstrate the presence of a basal OxS in response to CFTR deletion.

3.4 Basal inflammatory profile of CFTR^{-/-} cells

We initially evaluated the expression levels of inflammatory proteins by Western blot in CFTR^{-/-} and CTL cell homogenates under basal conditions. The inflammatory cytokines, TNF- α and IL-6, were more expressed in CFTR^{-/-} than in CTL cells (Fig 4A, 4B). We also evaluated the status of COX-2, a rate-limiting enzyme that catalyzes the biosynthesis of inflammatory prostaglandins from the arachidonic acid substrate. Its protein expression was found to be elevated in CFTR^{-/-} compared to CTL cells (Fig 4C). As the ubiquitous eukaryotic transcription factor NF- κ B is mainly responsible for regulating the induction of pro-inflammatory cytokines, we examined the potential of CFTR to cause its activation in intestinal epithelial cells. A markedly increased level of NF- κ B p65 subunit protein expression characterized CFTR^{-/-} cells (Fig 5A) without significant changes in I- κ B α (Fig 5B). The observed elevation of the NF- κ B p65 subunit/I- κ B α ratio indicated an enhanced activation NF- κ B p65 subunit in CFTR^{-/-} cells (Fig 5C). Taken together, these results underline the existence of an intrinsic inflammatory status in CFTR^{-/-} cells under basal conditions.

3.5 Oxidative response in CFTR^{-/-} cells in presence of Fe/Asc

We subsequently estimated the susceptibility of Caco-2/15 cells to develop OxS in response to a pro-oxidizing stimulus. To this end, CFTR^{-/-} and CTL cells were submitted to a mixture of Fe/Asc, which constitutes a powerful OxS inductor as illustrated in our previous studies (Taha *et al.*, 2010; Denis *et al.*, 2013; Yara *et al.*, 2013). The results showed an increase in MDA levels following the treatment of both cell types with Fe/Asc. However, MDA levels were more increased (123 %) in CFTR^{-/-} than in CTL cells (100%), but without reaching statistical significance (Fig 6A). In presence of the antioxidant Trolox, Fe/Asc-induced MDA levels were decreased but to a lesser degree in CFTR^{-/-} cells (Fig 6A). When the endogenous antioxidant enzyme activities were determined after the incubation of Fe/Asc, the activity of

GPx was substantially reduced in CFTR^{-/-} compared to CTL cells and the GPx decline persisted in CFTR^{-/-} cells after the addition of Trolox (Fig 6B). Albeit not significantly, CAT activity was lower in CFTR^{-/-} than in CTL cells especially when treated with Fe/Asc ± Trolox (Fig 6C). While no significant divergences were observed in total SOD activity regardless of the condition (Fig 6D), mitochondrial SOD (SOD-2) activity was diminished in CFTR^{-/-} cells in the presence of the pro-oxidant stimulus (Fig 6E). No differences were noticed between CFTR^{-/-} and CTL cells following the addition of Trolox (Fig 6E). Altogether, these results indicate the low capacity of intestinal epithelial CFTR^{-/-} cells to fight against an external oxidative stimulus.

3.6 Inflammatory response of CFTR^{-/-} cells to LPS

We evaluated the susceptibility of CFTR-deficient and control cells to develop inflammation in response to treatment with 100 µg/ml LPS from *Escherichia Coli*. Clearly, CFTR-deficient cells developed significantly greatest levels of TNF-α (Fig. 7A) and COX-2 (Fig. 7C) protein expression following Western blot analysis. Only a trend of increased protein expression of IL-6 (Fig. 7B) and NF-κB p65 subunit (Fig. 8A) as well as a rise of NF-κB p65 subunit/I-κBα ratio (Fig. 8C) characterized the Caco-2/15 cells deficient in CFTR.

4 DISCUSSION

Inflammation and OxS have been associated with CFTR mutations in CF patients 'airways (Hudson, 2001; Wood *et al.*, 2001; Day *et al.*, 2004; Brodlie *et al.*, 2011). However, this relationship has not been investigated in additional CF tissues. The GI tract is one of the most affected tissues by CFTR deficiency (Storni *et al.*, 2001). Thus, it appears imperative to characterise its pro-oxidant/anti-oxidant balance and inflammatory profile especially because conclusive evidence of the link between the primary defect in CF, abnormalities in intestinal redox balance and susceptibility to inflammation has yet to be demonstrated. Therefore, in the present work, we have tested the hypothesis that lack of functional CFTR in the small intestine promotes exaggerated pro-oxidative and inflammatory responses.

The intestinal Caco-2/15 cell line has a unique property to spontaneously differentiate into polarized mature enterocytes expressing several morphological and functional characteristics of the mature enterocyte such as vectorial transport and barrier functions. This remarkable intestinal model is regarded as the most appropriate tool for the investigation of gut absorption and wide interactions, nutrition, toxicology food microbiology and screening of drug permeability. In addition, our laboratory's studies demonstrated that the Caco-2/15 monolayer is fully appropriate for the investigation of lipid/lipoprotein homeostasis, OxS and inflammation (Courtois *et al.*, 2003; Mailhot *et al.*, 2009; Mailhot *et al.*, 2010; Precourt *et al.*, 2012). In our hands, this intestinal model has also been appropriate for genetic manipulation to highlight the role of specific genes (Sane *et al.*, 2006; Precourt *et al.*, 2009). However, it would be important in further studies to confirm our findings using mouse or human primary CF intestinal organoids since these intestinal models allow long-term expansion of intestinal stem cells into closed organoids, the reproduction of essential features of the *in vivo* tissue

architecture and the maintenance of long-term basic crypt-villus physiology (Sato *et al.*, 2009; Dekkers *et al.*, 2013).

Normally, CFTR is located at the apical pole of epithelial exocrine cells such as the enterocytes (Storni *et al.*, 2001). However, in response to severe mutations (e.g., Phe508del) the CFTR protein is totally missing at this location (Pilewski and Frizzell, 1999). We therefore performed total deletion of the *CFTR* gene in Caco-2/15 cells employing the innovative ZFN technique. The lack of *CFTR* transcripts and protein expression in genetically manipulated cell line was confirmed using semi-quantitative PCR and immunoblotting, respectively. Pilot studies in our laboratory validated the stability of CFTR loss over time and under various conditions without the deterioration of cell integrity, differentiation and viability. Prior studies undertook *CFTR* total deletion in mouse (Gosselin *et al.*, 1998; Koehler *et al.*, 2003), pig (Meyerholz *et al.*, 2010; Klymiuk *et al.*, 2012) and ferret (Sun *et al.*, 2010) to reproduce the CF human disease and these CFTR^{-/-} animals models appeared to be suitable for CF lung and GI tract investigation. Thus, we stipulate that our innovative CFTR^{-/-} intestinal cell line is appropriate for similar studies. Importantly, we did not determine CFTR-dependent chloride secretion since the total absence of CFTR mRNA and protein predicted no potential CFTR activity.

OxS is recognized as a potential key mechanism in the pathogenesis of CF. The GI mucosa is constantly exposed to luminal oxidants from ingested foods (Courtois *et al.*, 2000; Aw, 2005; Circu and Aw, 2012), such as cholesterol oxides (Nourooz-Zadeh and Appelqvist, 1988; Pie *et al.*, 1991; Wahle *et al.*, 1993), iron salts and ascorbic acid, frequently consumed together and forming reactive hydroxyl radicals (Courtois *et al.*, 2000). In addition, the intraluminal catalase-negative bacteria produce large quantities of H₂O₂, and xanthine oxidase from desquamated cells, which amplifies the generation of reactive oxygen metabolites (Parks *et al.*, 1988; Parks, 1989). Furthermore, the interaction between salivary peroxidases with H₂O₂ and thiocyanate induces the generation of hypothiocyanous acid, which may increase luminal reactive oxygen metabolite content (Courtois *et al.*, 2000). Clearly, the ingestion and/or occurrence of peroxides particularly in the long term can lead to the injury and dysfunction of the intestinal mucosa. However, the basic CF genetic defect itself may also be a source of OxS since CFTR mutations cause the accumulation of misfolded CFTR protein in the endoplasmic reticulum resulting in OxS (Rottner *et al.*, 2009) considered as the start point of NF-κB intrinsic activation (Verhaeghe, 2007). The innate defect of GSH transport reported in CF (Gao *et al.*, 1999) could lead to a decrease in enterocyte antioxidant defense as described in the lungs (Roum *et al.*, 1993; Hudson, 2001). Therefore, we assessed OxS and antioxidant defense in CFTR^{-/-} cells. Our results showed a spontaneous and significant elevation of lipid peroxidation (high MDA levels) along with vulnerable antioxidant defense (low GPx and CAT activities) in response to CFTR^{-/-}. GPx is a thiol-based enzyme that catalyzes the breakdown of damaging H₂O₂ and hydroperoxides to H₂O and stable alcohols. For its part, CAT is a tetrameric hemoprotein that converts H₂O₂ to H₂O and O₂. The decline of the activity of these two enzymes suggests that defects of CFTR overwhelms antioxidant defense and increases susceptibility to OxS in the intestine. An increase in OxS markers such as MDA and 8-isoprostanes is largely reported in CF (Wood *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2003;

Back *et al.*, 2004) and sometimes in association with a decreased GPx activity (Wood *et al.*, 2003). Moreover, those investigations reported ambiguous findings, including an unaffected activity of erythrocyte GPx along with a markedly decrease in CAT activity and a significant rise in SOD activity (Laskowska-Klita and Chelchowska, 2001).

In the present work, we postulate that the CFTR-defective Caco-2/15 cell line spontaneously develops pro-inflammatory features. Our results clearly demonstrate that CFTR deficiency enhanced the production of TNF- α and IL-6, as well as the expression of COX-2. It is likely that CFTR deletion exaggerated the production of cytokines through the NF- κ B pathway. We may therefore conclude that CFTR genetic defects implicate an up-regulation of powerful mechanisms of inflammation. It is worth mentioning that cytokines in our work were selected by referring to the CF context. We chose to explore the inflammatory transcription factor NF- κ B pathway because various studies reported the intrinsic activation of this factor in CF. Moreover NF- κ B is known to be an activator of various genes, including those of cytokines TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 and IL-8, as well as enzymes involved in OxS response such as COX-2. As frequent studies reported the markedly increase of TNF- α , IL-6 and COX-2 in CF and globally in intestine inflammation, (Reinecker *et al.*, 1993; Heeckeren *et al.*, 1997; Resta-Lenert and Barrett, 2002), we decided to use these inflammatory biomarkers in addition to NF- κ B in our investigation. Since the expression of IL-8 was induced by neutrophil proteases and during neutrophil-dominated inflammation, we had not chosen to test IL-8, especially as we employed pure intestinal epithelial cells without the presence of neutrophils.

We considered appropriate to explore oxidative and inflammatory responses in the presence of strong stimuli. To this end, we used Fe/Asc complex to generate OxS since this complex is recognized as a powerful lipid peroxidation inducer, causes oxidative damage to biological macromolecules, alters intracellular redox environment and is involved in numerous pathological states (Stevens *et al.*, 1994; Welch *et al.*, 2002; Bernotti *et al.*, 2003; Marcil *et al.*, 2010), whereas ascorbic acid can amplify the oxidative potential of iron by promoting metal ion-induced lipid peroxidation (Courtois *et al.*, 2000). It is noteworthy that the iron dose used in the current study is comparable to normal iron concentration in the gut (Babbs, 1992). The Fe/Asc system was repeatedly used as a strong oxygen-radical generating system in our previous studies. Since 90% of CF patients have lower haemoglobin concentrations in association with low serum ferritin and high carboxyhemoglobin levels, they receive oral iron therapy to correct deficiency (Ater *et al.*, 1983). In addition, most of patients receive vitamin complex that contains ascorbic acid and iron, which justifies the use of Fe/Asc in the present work. In the present study, Fe/Asc led to an increase of MDA that tended to be more important in CFTR^{-/-} cells probably because of their impaired antioxidant defense. The associated decrease in GPx and CAT activities was more pronounced in CFTR^{-/-} cells compared to CTL cells. We then used Trolox to neutralize Fe/Asc oxidant effect. Trolox is a water-soluble analogue of α tocopherol, which belongs to the family of vitamin E, capable to inhibit lipid peroxidation by scavenging lipid peroxy radicals (Hamad *et al.*, 2010). Our findings showed the effectiveness of Trolox to reduce MDA levels in CFTR^{-/-} and CTL cells. Trolox tends to normalize GPx activity in CTL cells but it is less efficient in CFTR^{-/-} cells. CAT and SOD activities were not re-established with Trolox in this work.

LPS is an ubiquitous endotoxin mediator of gram-negative bacteria and is able to stimulate the pro-inflammatory cytokine cascade leading to host immune response induction (Courtois *et al.*, 2003). Our results revealed a raised protein expression of NF- κ B p65 subunit, TNF- α , IL-6, Cox-2 and a markedly decreased protein expression of I- κ B α in presence of LPS and in both CFTR^{-/-} and CTL cells lines. Noteworthy, the rise of pro-inflammatory cytokines was more important in CFTR^{-/-} cells compared to CTL cells. Similarly, bacterial lung infections led to an exacerbation of the airways innate inflammation (Escotte *et al.*, 2003). Furthermore, Pfeffer and *al.* had demonstrated that the exposure of CF alveolar macrophages to *Pseudomonas aeruginosa* LPS led to an intense production of TNF- α , which was incriminated in anorexia and cachexia noticed in CF patients (Pfeffer *et al.*, 1993).

5 CONCLUSION

OxS and inflammation are now recognized as the main pathophysiological actors in CF airways disruptions. As the intestine is one of the organs, that harbors the greatest number of CFTR transcripts after birth, we hypothesize that it could also exhibit oxidative and inflammation characteristics in case of CFTR defect. In our study, CFTR^{-/-} cells that mimicked intestinal epithelial cells of CF, spontaneously showed inflammatory and oxidative characteristics and thus suggests a probable innate activation of these processes in CF intestine. Moreover, in the presence of oxidative or inflammatory stimuli, intestinal epithelial cells of CF respond more intensely than CTL cells. In such a case, lipid metabolism could be impaired and must be more explored taking account of these two factors.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: CFTR gene and protein expression in CTL and CFTR^{-/-} cells.

Following ZFN treatment, Caco-2/15 cells were allowed to proliferate until confluence and differentiate for 15 days before being tested for CFTR transcript levels (A) and protein mass (B) by RT-PCR and Western blotting, respectively. The experiments were performed in Caco-2/15 cells with GAPDH as a housekeeping gene and β -actin as a reference protein even if identical protein amounts of cell homogenates were applied on SDS-PAGE. Values are means \pm SEM of 5 independent experiments, each performed in triplicate

*** $P < 0.001$ and **** $P < 0,0001$ vs. CTL.

Figure 2: Integrity of CFTR^{-/-} cells

The effect of CFTR expression manipulation on cell monolayer integrity was monitored by assessment of villin protein expression and sucrase activity (as markers of cell differentiation), as well as occludin and transepithelial resistance (TER) as indicators of cell permeability and tight junction reliability. Values are means \pm SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicate.

Figure 3: OxS and antioxidant defense markers in Caco-2/15 cells with CFTR^{-/-}

Following ZFN treatment and cellular differentiation, cells were trypsinized, harvested and homogenized. OxS was assessed by the determination of (A) malondialdehyde (MDA), whereas the antioxidant defense was evaluated by the enzymatic activity measurement of: (B) glutathione peroxidase (GPx); (C) catalase (CAT); (D) total superoxide dismutase (SOD); and (E) mitochondrial SOD (SOD-2). Values are means \pm SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicate. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. CTL.

Figure 4: Inflammatory response to CFTR^{-/-} in Caco-2/15 cells under basal conditions

Following ZFN treatment, Caco-2/15 cells were allowed to differentiate. Then, they were trypsinized, harvested and homogenized. Protein mass of (A) Tumor necrosis factor (TNF- α), (B) Interleukin-6 (IL-6) and (C) Cyclooxygenase-2 (COX-2) was analyzed by Western blotting. Values are means \pm SEM of 3-4 independent experiments, each done in triplicate. ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$ vs. CTL.

Figure 5: Status of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65 subunit protein expression in CFTR^{-/-} cells under basal conditions.

Following CFTR silencing by the ZFN technology to knockout *CFTR* gene expression, differentiated Caco-2/15 cells were trypsinized, harvested and homogenized. The protein expression of (A) NF- κ B p65 subunit and (B) I κ B α was assessed by Western blot. The (C) NF- κ B p65 subunit-to-I- κ B α ratio was calculated. Values are means \pm SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicate. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs. CTL.

Figure 6: Oxidative response of CFTR^{-/-} cells to Fe/Asc oxidative stimulus

Cells were treated with the ZFN technology to knockout *CFTR* gene expression. Following their differentiation, they were exposed to iron/ascorbate (Fe/Asc) and incubated for 6 hours

at 37°C. Thereafter, they were collected and homogenized to determine (A) MDA and the enzymatic activity of (B) GPx, (C) catalase, (D) total SOD, and (E) SOD-2. Values are means \pm SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicate. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. CTL.

Figure 7: Inflammatory response of CFTR^{-/-} cells to LPS stimulus

Cells were treated with the ZFN technology to knockout *CFTR* gene expression. Following their differentiation, they were exposed to lipopolysaccharide (LPS) and incubated for 6 hours at 37°C. Thereafter, they were collected and homogenized to determine the protein mass of (A) TNF- α , (B) IL-6 and (C) COX-2 by Western blotting. Values are means \pm SEM of 3-4 independent experiments, each performed in triplicate. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. controls. * $P < 0,05$ vs. CTL.

Figure 8: Protein expression of NF- κ B p65 subunit and I- κ B α in CFTR^{-/-} cells after LPS stimulus

Cells were treated with the ZFN technology to knockout *CFTR* gene expression. Following their differentiation, they were exposed to lipopolysaccharide (LPS) and incubated for 6 hours at 37°C. Thereafter, they were collected and homogenized to determine the protein mass of (A) NF- κ B p65 subunit and (B) I- κ B α was assessed by Western blot while the (C) NF- κ B p65 subunit/I- κ B α ratio was calculated. Values are means \pm SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicate.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mrs. Schohraya Spahis for her technical assistance. The current work was supported by research grants from the Canadian Cystic Fibrosis Foundation (CFC-FKC-2388; CFC-FKC-3007) and the JA deSève Research Chair in nutrition (EL). The authors declare that no competing interests exist.

REFERENCES

- Ater, J.L., Herbst, J.J., Landaw, S.A., and O'Brien, R.T. (1983). Relative anemia and iron deficiency in cystic fibrosis. *Pediatrics* 71, 810-814.
- Aw, T.Y. (2005). Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicology and applied pharmacology* 204, 320-328.
- Babbs, C.F. (1992). Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free radical biology & medicine* 13, 169-181.
- Back, E., Frindt, C., Nohr, D., Frank, J., Ziebach, R., Stern, M., Ranke, M., and Biesalski, H.K. (2004). Antioxidant deficiency in cystic fibrosis: when is the right time to take action? *American Journal of Clinical Nutrition* 80, 374-384.
- Bensalem, N., Ventura, A.P., Vallee, B., Lipecka, J., Tondelier, D., Davezac, N., Dos Santos, A., Perretti, M., Fajac, A., Sermet-Gaudelus, I., Renouil, M., Lesure, J.F., Halgand, F., Laprevote, O., and Edelman, A. (2005). Down-regulation of the anti-inflammatory protein annexin A1 in cystic fibrosis knock-out mice and patients. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 4, 1591-1601.
- Bernotti, S., Seidman, E., Sinnott, D., Brunet, S., Dionne, S., Delvin, E., and Levy, E. (2003). Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285, G898-906.
- Bradbury, N.A., Jilling, T., Berta, G., Sorscher, E.J., Bridges, R.J., and Kirk, K.L. (1992). Regulation of plasma membrane recycling by CFTR. *Science* 256, 530-532.
- Brodlie, M., McKean, M.C., Johnson, G.E., Anderson, A.E., Hilkens, C.M.U., Fisher, A.J., Corris, P.A., Lordan, J.L., and Ward, C. (2011). Raised interleukin-17 is immunolocalised to neutrophils in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 37, 1378-1385.
- Bruzzese, E., Raia, V., Gaudiello, G., Polito, G., Buccigrossi, V., Formicola, V., and Guarino, A. (2004). Intestinal inflammation is a frequent feature of cystic fibrosis and is reduced by probiotic administration. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 20, 813-819.
- Cantin, A.M., White, T.B., Cross, C.E., Forman, H.J., Sokol, R.J., and Borowitz, D. (2007). Antioxidants in cystic fibrosis. Conclusions from the CF antioxidant workshop, Bethesda, Maryland, November 11-12, 2003. *Free radical biology & medicine* 42, 15-31.

Caro, A.A., and Cederbaum, A.I. (2007). Role of intracellular calcium and phospholipase A2 in arachidonic acid-induced toxicity in liver cells overexpressing CYP2E1. *Archives of biochemistry and biophysics* 457, 252-263.

Chanson, M. (2009). mucoviscidose, déséquilibre en acides gras, céramides et radeaux membranaires. *Archives de pédiatrie* 16, 543-545.

Chen, J., Kinter, M., Shank, S., Cotton, C., Kelley, T.J., and Ziady, A.G. (2008). Dysfunction of Nrf-2 in CF epithelia leads to excess intracellular H₂O₂ and inflammatory cytokine production. *PLoS ONE* 3, e3367, 1-12.

Circu, M.L., and Aw, T.Y. (2012). Intestinal redox biology and oxidative stress. *Seminars in cell & developmental biology* 23, 729-737.

Courtois, F., Seidman, G.E., Delvin, E., Asselin, C., Bernotti, S., Ledoux, M., and Levy, E. (2003). Membrane peroxidation by lipopolysaccharide and iron-ascorbate adversely affects Caco-2 cell function: beneficial role of butyric acid. *American Journal of Clinical Nutrition* 77, 744-750.

Courtois, F., Suc, I., Garofalo, C., Ledoux, M., Seidman, E., and Levy, E. (2000). Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G12-19.

Day, B.J., van Heeckeren, A.M., Min, E., and Velsor, L.W. (2004). Role for Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein in a Glutathione Response to Bronchopulmonary Pseudomonas Infection. *Infection and Immunity* 72, 2045-2051.

Dekkers, J.F., Wiegerinck, C.L., de Jonge, H.R., Bronsveld, I., Janssens, H.M., de Winter-de Groot, K.M., Brandsma, A.M., de Jong, N.W., Bijvelds, M.J., Scholte, B.J., Nieuwenhuis, E.E., van den Brink, S., Clevers, H., van der Ent, C.K., Middendorp, S., and Beekman, J.M. (2013). A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med* 19, 939-945.

Denis, M.C., Furtos, A., Dudonne, S., Montoudis, A., Garofalo, C., Desjardins, Y., Delvin, E., and Levy, E. (2013). Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. *PLoS ONE* 8, 1-17.

Dorsey, J., Buckley, D., Summer, S., Jandacek, R.J., Rider, T., Tso, P., Narkewicz, M.R., and Heubi, J.E. (2010). Fat malabsorption in cystic fibrosis: comparison of quantitative fat assay and a novel assay using fecal lauric/behenic acid. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 50, 441-446.

Durieu, I., and Josserand, R.N. (2008). Cystic fibrosis in 2008. *La Revue de medecine interne* 29, 901-907.

- Escaffit, F., Pare, F., Gauthier, R., Rivard, N., Boudreau, F., and Beaulieu, J.F. (2006). Cdx2 modulates proliferation in normal human intestinal epithelial crypt cells. *Biochemical and biophysical research communications* 342, 66-72.
- Escotte, S., Tabary, O., Dusser, D., Majer-Teboul, C., Puchelle, E., and Jacquot, J. (2003). Fluticasone reduces IL-6 and IL-8 production of cystic fibrosis bronchial epithelial cells via IKK- kinase pathway. *Eur Respir J* 21, 574-581.
- Gao, L., Kim, K.J., Yankaskas, J.R., and Forman, H.J. (1999). Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Physiol* 277, L113-118.
- Gosselin, D., Stevenson, M.M., Cowley, E.A., Griesenbach, U., Eidelman, D.H., Boule, M., Tam, M.F., Kent, G., Skamene, E., Tsui, L.C., and Radzioch, D. (1998). Impaired ability of Cfr knockout mice to control lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 1253-1262.
- Guggino, W.B. (2004). The cystic fibrosis transmembrane regulator forms macromolecular complexes with PDZ domain scaffold proteins. *Proceedings of the American Thoracic Society* 1, 28-32.
- Hamad, I., Arda, N., Pekmez, M., Karaer, S., and Temizkan, G. (2010). Intracellular scavenging activity of Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of natural science, biology, and medicine* 1, 16-21.
- Heeckeren, A., Walenga, R., Konstan, M.W., Bonfield, T., Davis, P.B., and Ferkol, T. (1997). Excessive inflammatory response of cystic fibrosis mice to bronchopulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Investigation* 100, 2810-2815.
- Hudson, V.M. (2001). Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation. *Free radical biology & medicine* 30, 1440-1461.
- Jiang, Z.Y., Woollard, A.C., and Wolff, S.P. (1991). Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe² in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26, 853-856.
- Kelly, M., Trudel, S., Brouillard, F., Bouillaud, F., Colas, J., Nguyen-Khoa, T., Ollero, M., Edelman, A., and Fritsch, J. (2010). Cystic fibrosis transmembrane regulator inhibitors CFTR(inh)-172 and GlyH-101 target mitochondrial functions, independently of chloride channel inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 333, 60-69.

Klymiuk, N., Mundhenk, L., Kraehe, K., Wuensch, A., Plog, S., Emrich, D., Langenmayer, M.C., Stehr, M., Holzinger, A., Kroner, C., Richter, A., Kessler, B., Kurome, M., Eddicks, M., Nagashima, H., Heinritzi, K., Gruber, A.D., and Wolf, E. (2012). Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. *J Mol Med* 90, 597-608.

Koehler, D.R., Sajjan, U., Chow, Y.H., Martin, B., Kent, G., Tanswell, A.K., McKerlie, C., Forstner, J.F., and Hu, J. (2003). Protection of Cfr knockout mice from acute lung infection by a helper-dependent adenoviral vector expressing Cfr in airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15364-15369.

Laskowska-Klita, T., and Chelchowska, M. (2001). Antioxidant status in erythrocytes of cystic fibrosis children. *Acta Biochim Pol* 48, 283-285.

Levy, E., Garofalo, C., Thibault, L., Dionne, S., Daoust, L., Lepage, G., and Roy, C.C. (1992). Intraluminal and intracellular phases of fat absorption are impaired in essential fatty acid deficiency. *The American physiological society* 8, G319-326.

Levy, E., Lepage, G., Bendayan, M., Ronco, N., Thibault, L., Galiano, N., Smith, L., and Roy, C.C. (1989). Relationship of decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities to essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients. *Journal of Lipid Research* 30, 1197-1209.

Levy, E., Trudel, K., Bendayan, M., Seidman, E., Delvin, E., Elchebly, M., Lavoie, J.C., Precourt, L.P., Amre, D., and Sinnett, D. (2007). Biological role, protein expression, subcellular localization, and oxidative stress response of paraoxonase 2 in the intestine of humans and rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293, G1252-1261.

Lewindon, P.J., Robb, T.A., Moore, D.J., Davidson, G.P., and Martin, A.J. (1998). Bowel dysfunction in cystic fibrosis: importance of breath testing. *Journal of paediatrics and child health* 34, 79-82.

Lisowska, A., Wójtowicz, J., and Walkowiak, J. (2009). Small intestine bacterial overgrowth is frequent in cystic fibrosis: combined hydrogen and methane measurements are required for its detection. *Acta Biochimica Polonica* 56, 631-634.

Mailhot, G., Rabasa-Lhoret, R., Moreau, A., Berthiaume, Y., and Levy, E. (2010). CFTR depletion results in changes in fatty acid composition and promotes lipogenesis in intestinal Caco 2/15 cells. *PLoS ONE* 5, e10446, 1-15.

Mailhot, G., Ravid, Z., Barchi, S., Moreau, A., Rabasa-Lhoret, R., and Levy, E. (2009). CFTR knockdown stimulates lipid synthesis and transport in intestinal Caco-2/15 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297, G1239-1249.

Marcil, V., Seidman, E., Sinnett, D., Boudreau, F., Gendron, F.P., Beaulieu, J.F., Menard, D., Precourt, L.P., Amre, D., and Levy, E. (2010). Modification in oxidative stress, inflammation, and lipoprotein assembly in response to hepatocyte nuclear factor 4alpha knockdown in intestinal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 285, 40448-40460.

Mccords, J.M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry* 244. 6049-6055.

Meyerholz, D.K., Stoltz, D.A., Pezzulo, A.A., and Welsh, M.J. (2010). Pathology of gastrointestinal organs in a porcine model of cystic fibrosis. *The American journal of pathology* 176, 1377-1389.

Mouterde, O. (2007). Manifestations digestives et nutritionnelles de la mucoviscidose. *Revue francophone des laboratoires* 397, 43-47.

Munck, A. (2005). Atteinte digestive de la mucoviscidose chez l'enfant *Médecine Thérapeutique Pédiatrie* 8, 197-203.

Naruse, S. (2002). cystic fibrosis and related diseases of the pancreas *Best practice and Research. Clinical gastroenterology* 16, 511-526.

Norkina, O., Burnett, T.G., and De Lisle, R.C. (2004). Bacterial overgrowth in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator null mouse small intestine. *Infect Immun* 72, 6040-6049.

Nourooz-Zadeh, J., and Appelqvist, L.-A. (1988). Cholesterol Oxides in Swedish Foods and Food Ingredients: Milk Powder Products. *Journal of food science* 53, 74-79.

Parks, D.A. (1989). Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut* 30, 293-298.

Parks, D.A., Williams, T.K., and Beckman, J.S. (1988). Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol* 254, G768-774.

Peretti, N., Marcil, V., Drouin, E., and Levy, E. (2005). Mechanisms of lipid malabsorption in Cystic Fibrosis: the impact of essential fatty acids deficiency. *Nutrition & metabolism* 2, 1-18.

Peretti, N., Roy, C.C., Drouin, E., Seidman, E., P., B., Casimir, G., and Levy, E. (2006). Abnormal intracellular lipid processing contributes to fat malabsorption in cystic fibrosis patients. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology* 290, G609-615.

- Pfeffer, K.D., Huecksteadt, T.P., and Hoidal, J.R. (1993). Expression and Regulation of Tumor Necrosis Factor in Macrophages from Cystic Fibrosis Patients. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9, 511-519.
- Pie, J.E., Spahis, K., and Seillan, C. (1991). Cholesterol Oxidation in Meat Products during Cooking and Frozen Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 250-254.
- Pier, G.B. (2002). CFTR mutations and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Current opinion in microbiology* 5, 81-86.
- Pilewski, J., and Frizzell, R. (1999). The CFTR in airways disease.pdf. *Physiological Review* 79, S215-S252.
- Precourt, L.P., Marcil, V., Ntimbane, T., Taha, R., Lavoie, J.C., Delvin, E., Seidman, E.G., Beaulieu, J.F., and Levy, E. (2012). Antioxidative properties of paraoxonase 2 in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303, G623-634.
- Precourt, L.P., Seidman, E., Delvin, E., Amre, D., Deslandres, C., Dominguez, M., Sinnett, D., and Levy, E. (2009). Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41, 1628-1637.
- Quigley, E.M., and Quera, R. (2006). Small intestinal bacterial overgrowth: roles of antibiotics, prebiotics, and probiotics. *Gastroenterology* 130, S78-90.
- Raia, V., Maiuri, L., de Ritis, G., de Vizia, B., Vacca, L., Conte, R., Auricchio, S., and Londei, M. (2000). Evidence of Chronic Inflammation in Morphologically Normal Small Intestine of Cystic Fibrosis Patients. *Pediatric Research* 47, 344-350.
- Ravilly, S., Roux, E.L., Bellis, G., and Dufour, F. (2007). Epidémiologie et physiopathologie de la mucoviscidose. *Revue francophone des laboratoires* 397, 26-36.
- Reinecker, H.C., Steffen, M., Witthoef, T., Pflueger, I., Schreiber, S., MacDermott, R.P., and Raedler, A. (1993). Enhanced secretion of tumour necrosis factor- α , IL-6, and IL-1 β by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 94, 174-181.
- Reis, F.J., and Damaceno, N. (1998). Cystic fibrosis. *Jornal de pediatria* 74 *Suppl 1*, S76-94.
- Resta-Lenert, S., and Barrett, K.E. (2002). Enteroinvasive bacteria alter barrier and transport properties of human intestinal epithelium: role of iNOS and COX-2. *Gastroenterology* 122, 1070-1087.

- Rottner, M., Freyssinet, J.M., and Martinez, M.C. (2009). Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. *Respiratory research* 10, 1-11.
- Roum, J.H., Buhl, R., McElvaney, N.G., Borok, Z., and Crystal, R.G. (1993). Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* 75, 2419-2424.
- Sane, A.T., Sinnett, D., Delvin, E., Bendayan, M., Marcil, V., Menard, D., Beaulieu, J.F., and Levy, E. (2006). Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res* 47, 2112-2120.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., and Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262-265.
- Sbarbati, A., Bertini, M., Catassi, C., Gagliardini, R., and Osculati, F. (1998). Ultrastructural Lesions in the Small Bowel of Patients with Cystic Fibrosis. *Pediatric Research* 43, 234-239.
- Smyth, R.L., Croft, N.M., O’Hea, U., Marshall, T.G., and Ferguson, A. (2000). Intestinal inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 82, 394-400.
- Stevens, R.G., Graubard, B.I., Micozzi, M.S., Neriishi, K., and Blumberg, B.S. (1994). Moderate elevation of body iron level and increased risk of cancer occurrence and death. *Int J Cancer* 56, 364-369.
- Storni, V., Claustres, M., Chinet, T., and Ravilly, S. (2001). Diagnostic de la mucoviscidose. *Archives pédiatriques* 8,818-832.
- Strandvik, B. (2010). Fatty acid metabolism in cystic fibrosis. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 83, 121-129.
- Sun, X., Sui, H., Fisher, J.T., Yan, Z., Liu, X., Cho, H.J., Joo, N.S., Zhang, Y., Zhou, W., Yi, Y., Kinyon, J.M., Lei-Butters, D.C., Griffin, M.A., Naumann, P., Luo, M., Ascher, J., Wang, K., Frana, T., Wine, J.J., Meyerholz, D.K., and Engelhardt, J.F. (2010). Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 120, 3149-3160.
- Taha, R., Seidman, E., Mailhot, G., Boudreau, F., Gendron, F.P., Beaulieu, J.F., Menard, D., Delvin, E., Amre, D., and Levy, E. (2010). Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 cell line. *PLoS ONE* 5, e11817,1-10.
- Thomson, A.B., Chopra, A., Clandinin, M.T., and Freeman, H. (2012). Recent advances in small bowel diseases: Part II. *World journal of gastroenterology : WJG* 18, 3353-3374.

Van Elburg, R.M., Uil, J.J., Van Aalderen, W.M.C., Mulder, C.J.J., and Heymans, H.S.A. (1996). Intestinal Permeability in Exocrine Pancreatic Insufficiency Due to Cystic Fibrosis or Chronic Pancreatitis. *Pediatric Research* 39, 985-991.

Verhaeghe, C. (2007). Etude des mécanismes moléculaires responsables d'un état inflammatoire intrinsèque dans la mucoviscidose, Université de Liège, Liège. 1-112.

Wahle, K.W.J., Hoppeb, P.P., and McIntosh, G. (1993). Effects of Storage and Various Intrinsic Vitamin E Concentrations on Lipid Oxidation in Dried Egg Powders. *Journal of the science of food and agriculture* 61, 34-40.

Wang, X., Venable, J., LaPointe, P., Hutt, D.M., Koulov, A.V., Coppinger, J., Gurkan, C., Kellner, W., Matteson, J., Plutner, H., Riordan, J.R., Kelly, J.W., Yates, J.R., 3rd, and Balch, W.E. (2006). Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell* 127, 803-815.

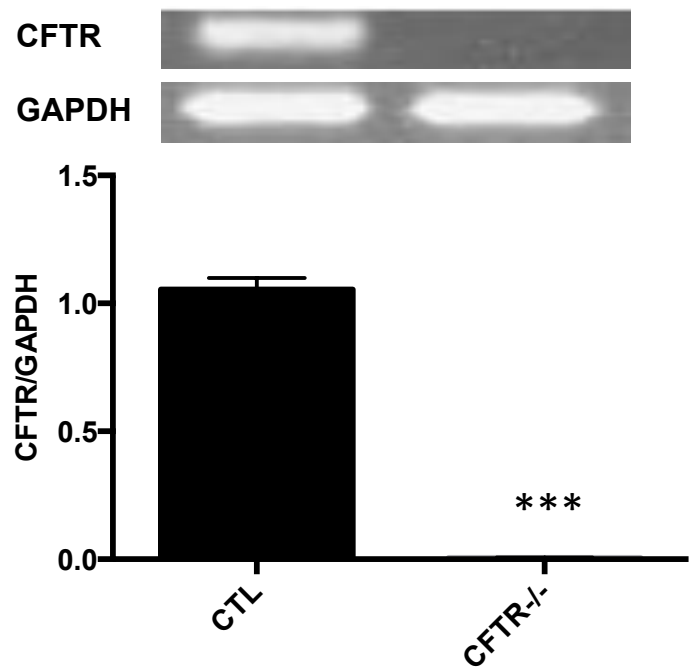
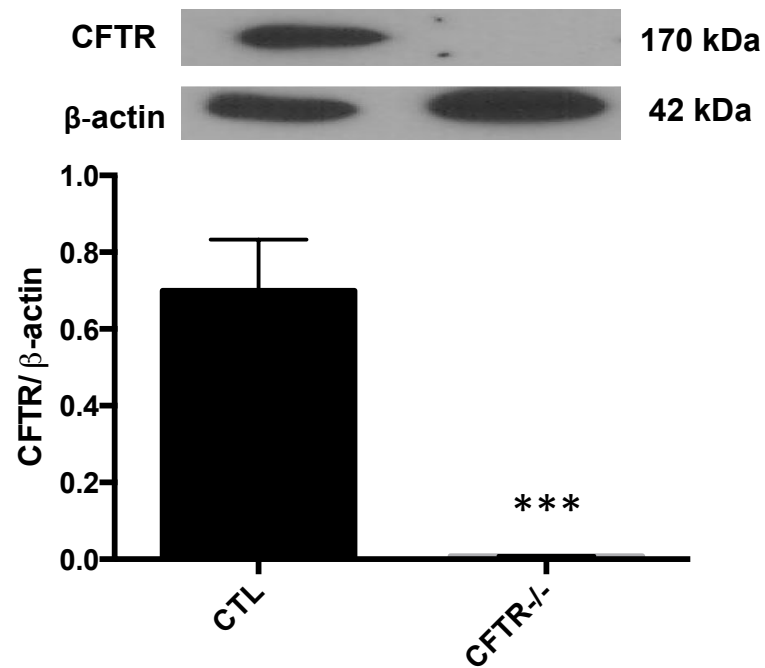
Welch, K.D., Davis, T.Z., Van Eden, M.E., and Aust, S.D. (2002). Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free radical biology & medicine* 32, 577-583.

Wine, J.J. (2001). Cystic fibrosis: The 'bicarbonate before chloride' hypothesis. *Current Biology* 11, R463-66.

Wood, L.G., Fitzgerald, D.A., Gibson, P.G., Cooper, D.M., Collins, C.E., and Garg, M.L. (2001). Oxidative Stress in Cystic Fibrosis: Dietary and Metabolic Factors. *Journal of the American College of Nutrition* 20, 157-165.

Wood, L.G., Fitzgerald, D.A., Lee, A.K., and Garg, M.L. (2003). Improved antioxidant and fatty acid status of patients with cystic fibrosis after antioxidant supplementation is linked to improved lung function. *American Journal of Clinical Nutrition* 77, 150-159.

Yara, S., Lavoie, J.C., Beaulieu, J.F., Delvin, E., Amre, D., Marcil, V., Seidman, E., and Levy, E. (2013). Iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation causes epigenetic changes in the antioxidant defense in intestinal epithelial cells: impact on inflammation. *PLoS ONE* 8, 1-11.

A**B**

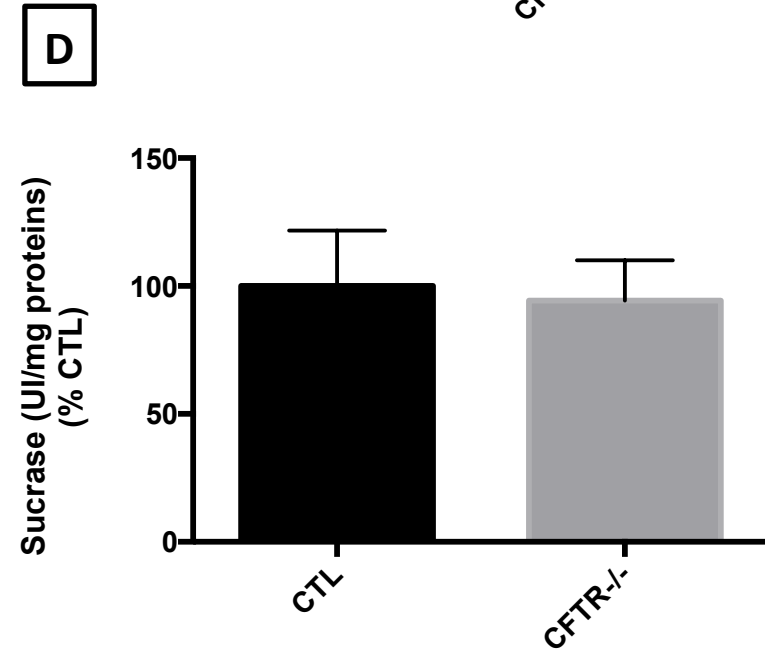
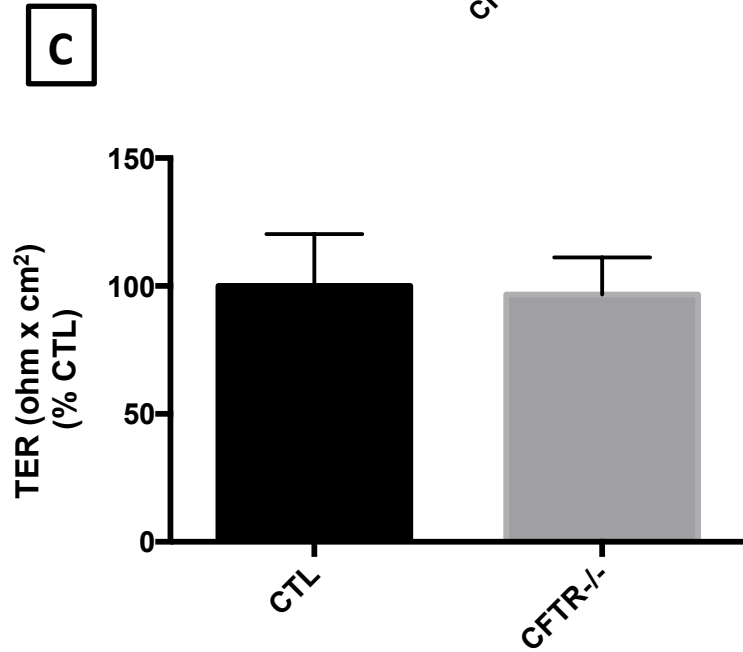
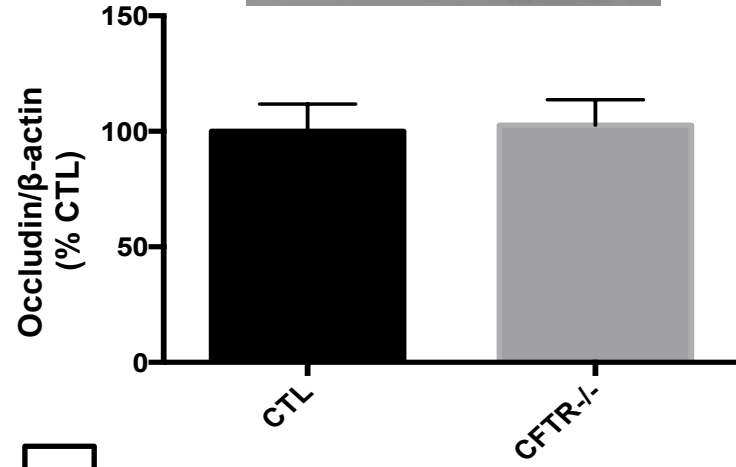
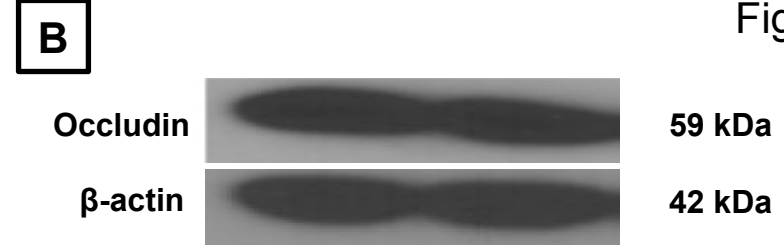
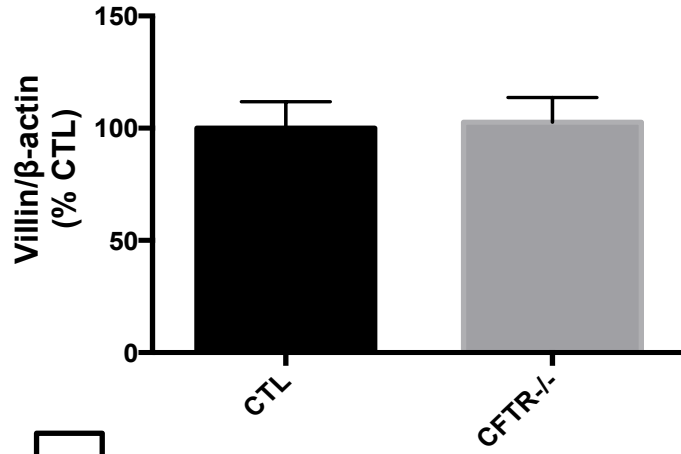
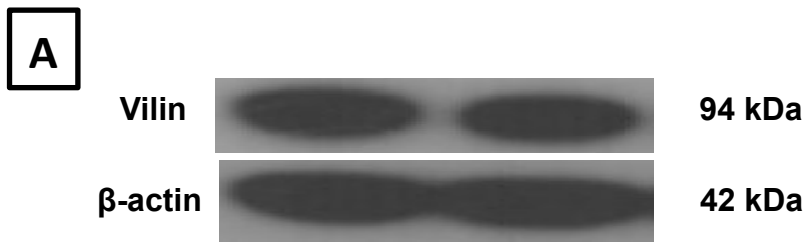
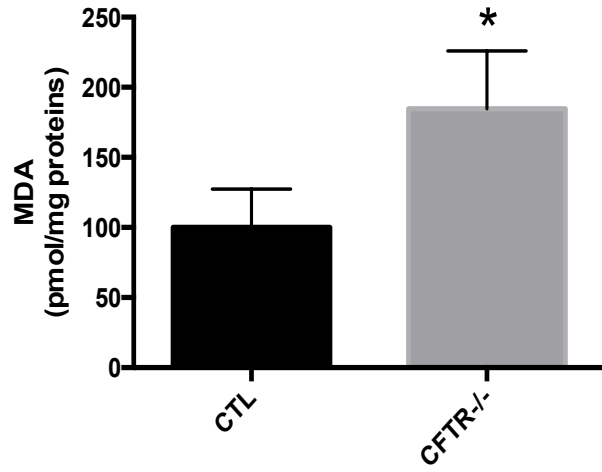
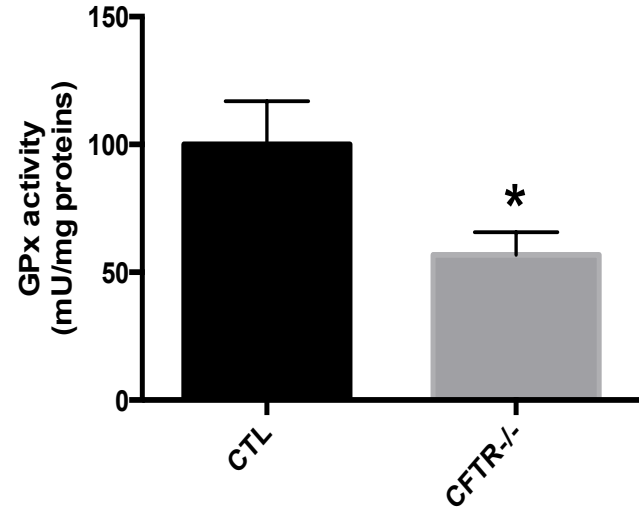


Figure 3

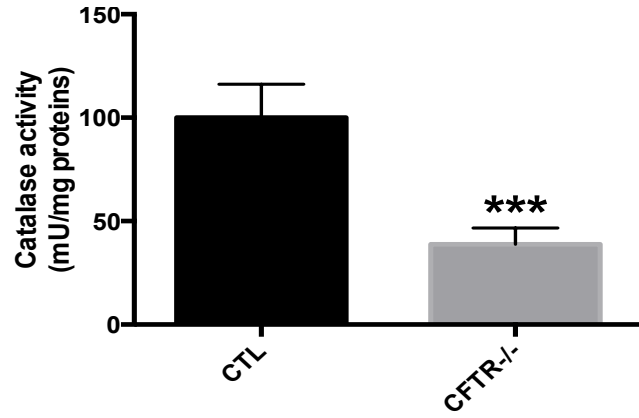
A



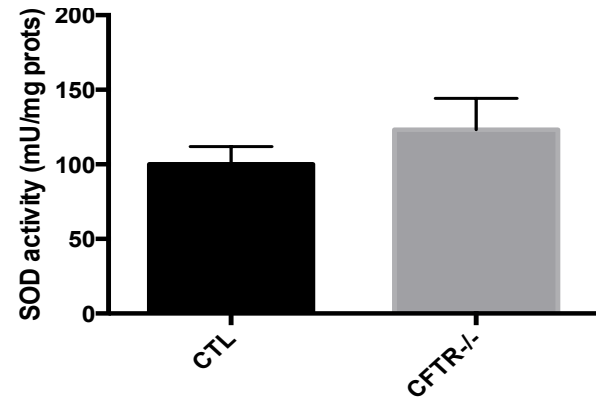
B



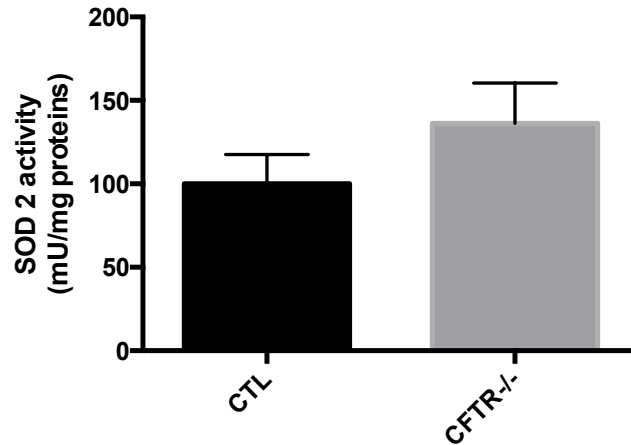
C

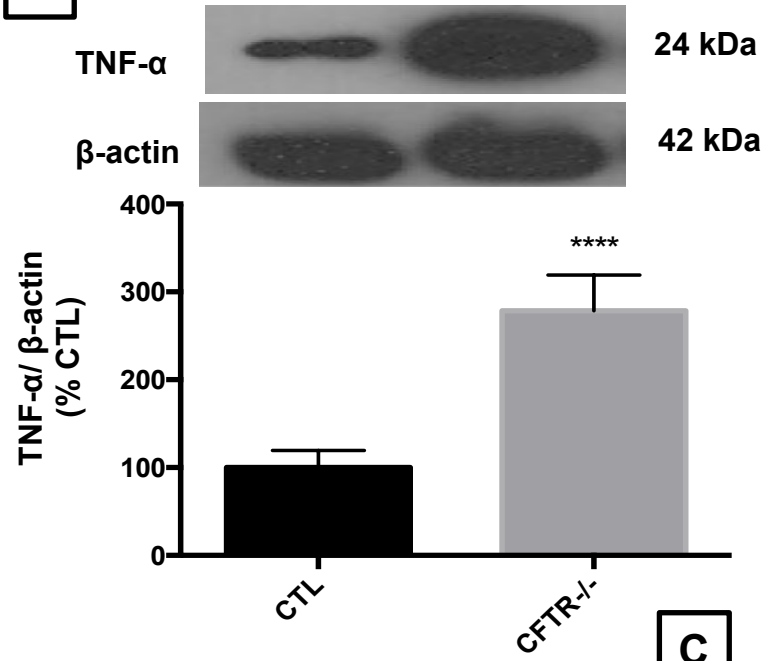
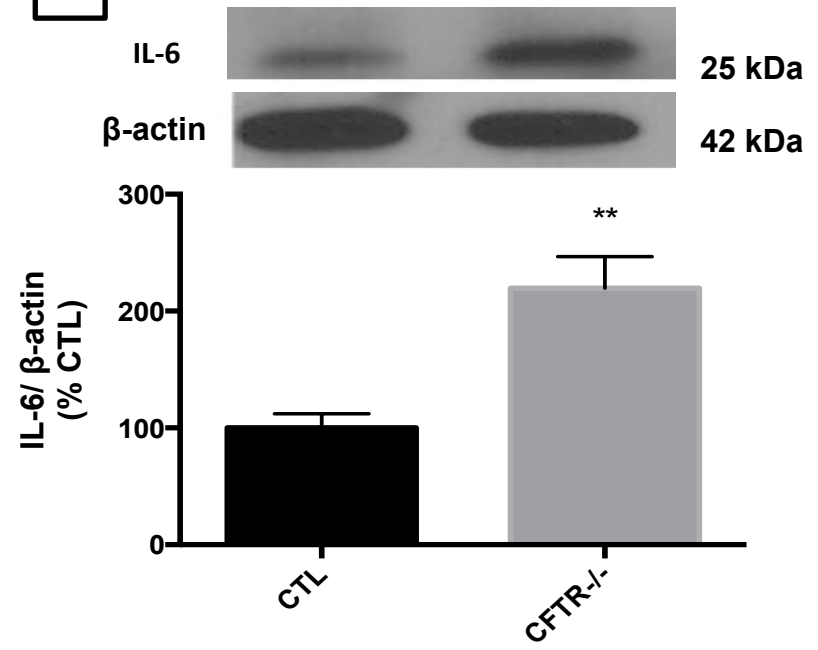
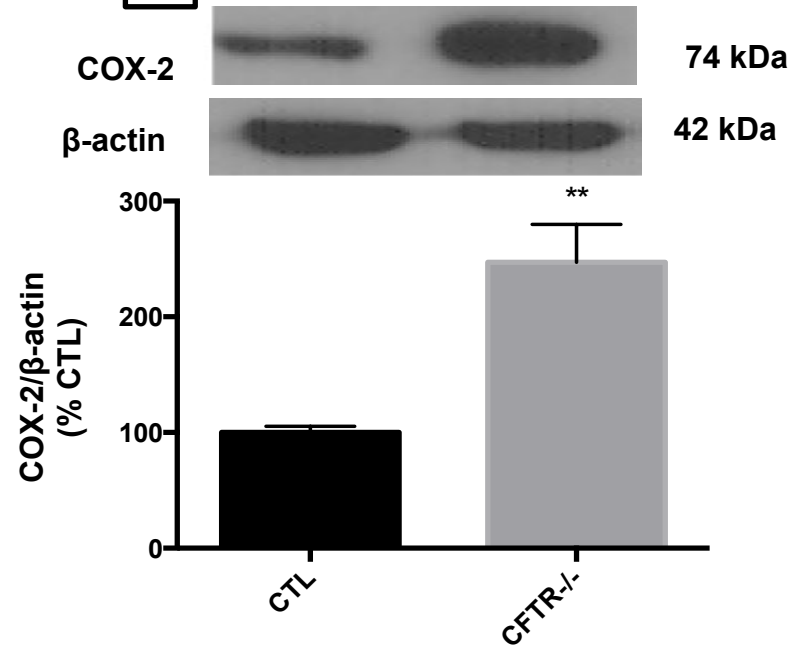


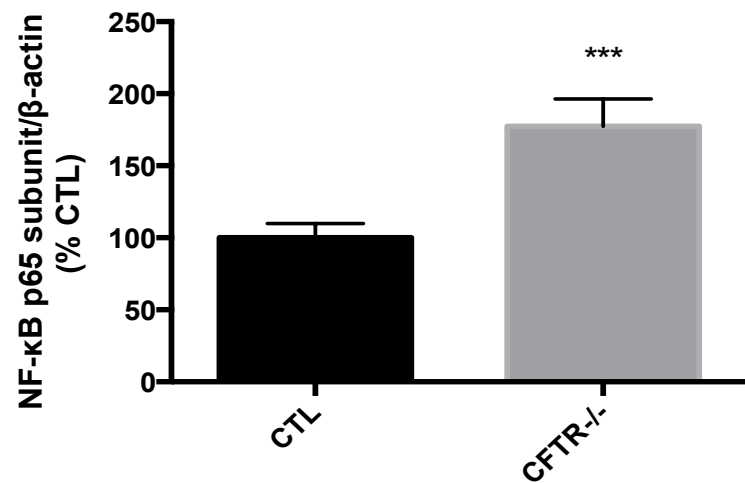
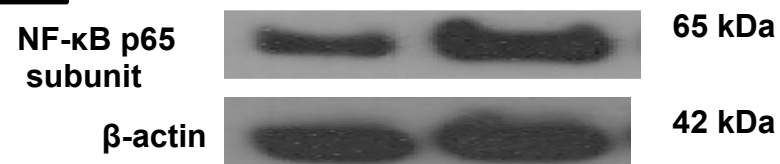
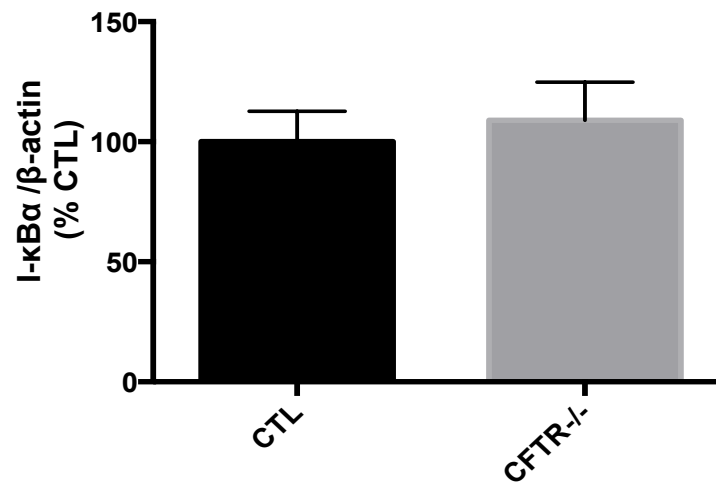
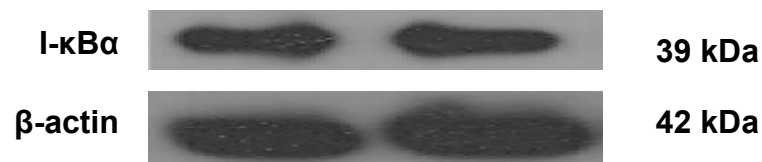
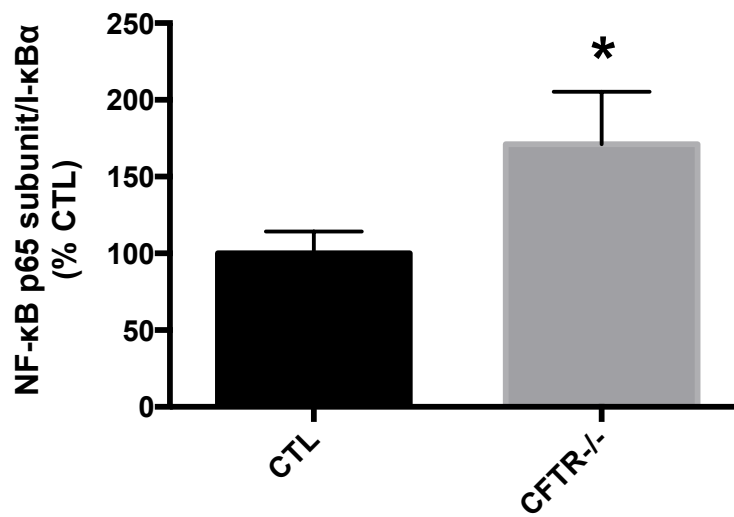
D

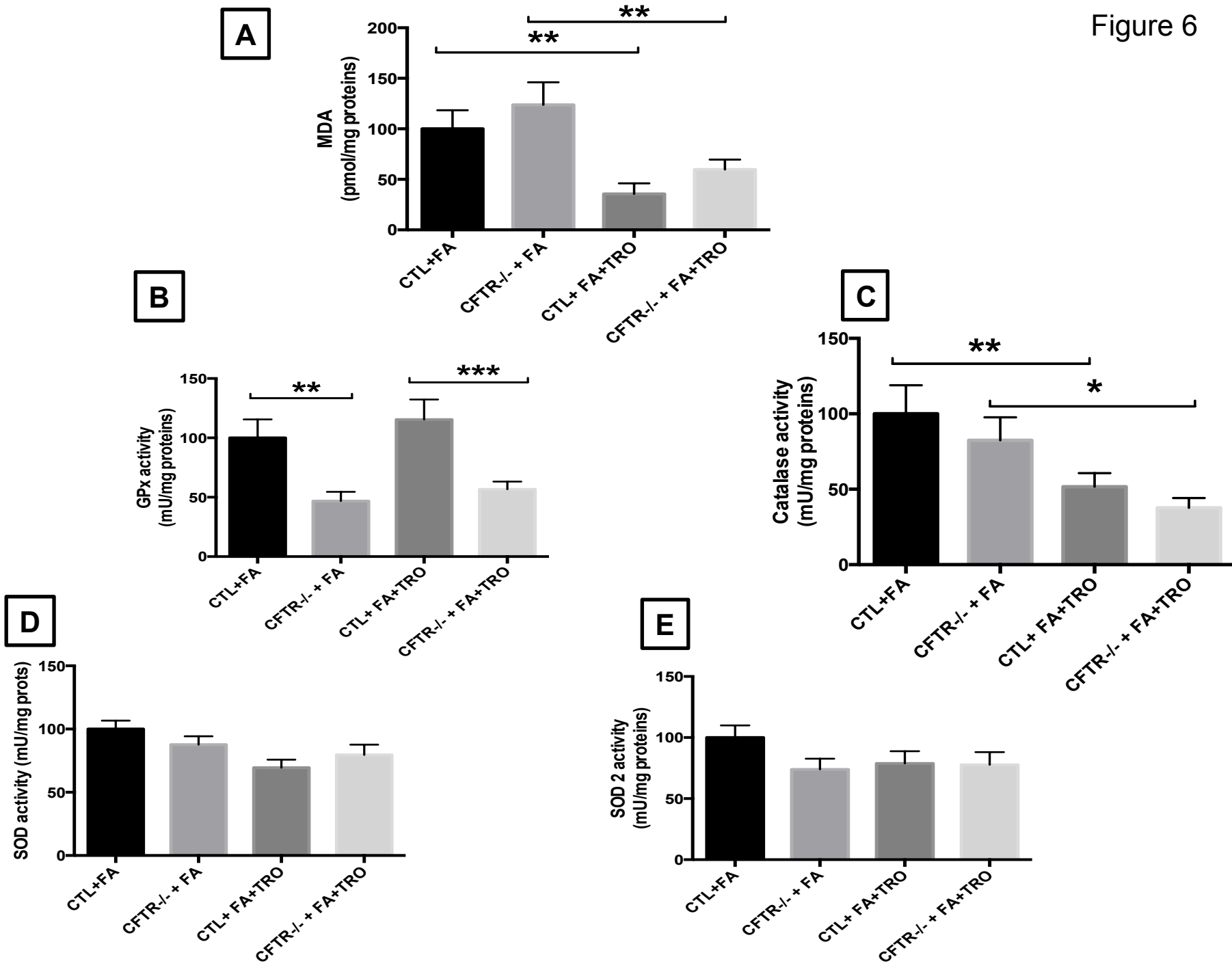


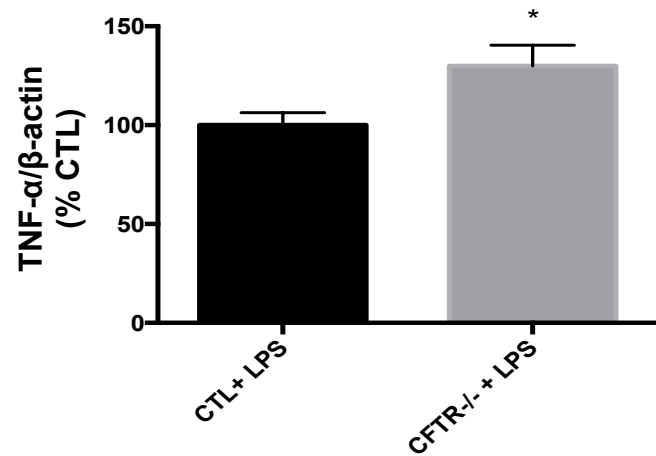
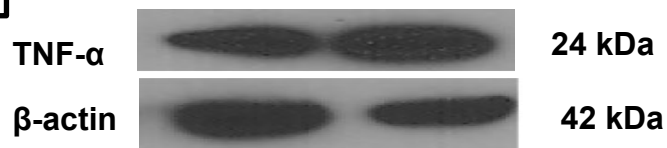
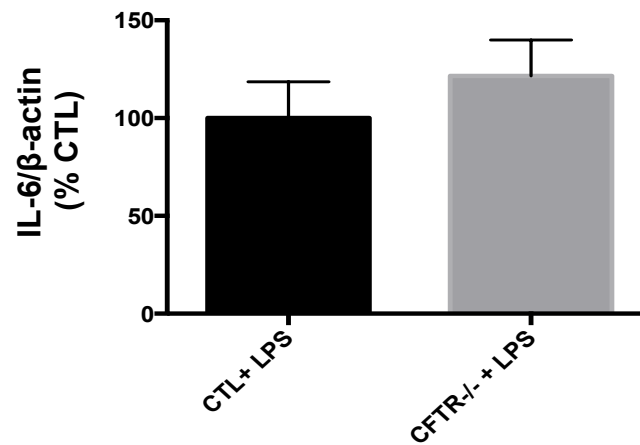
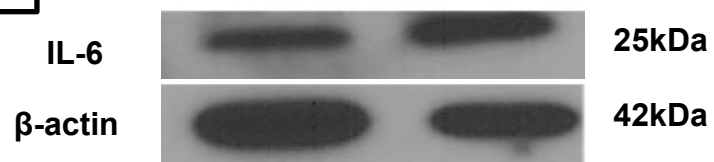
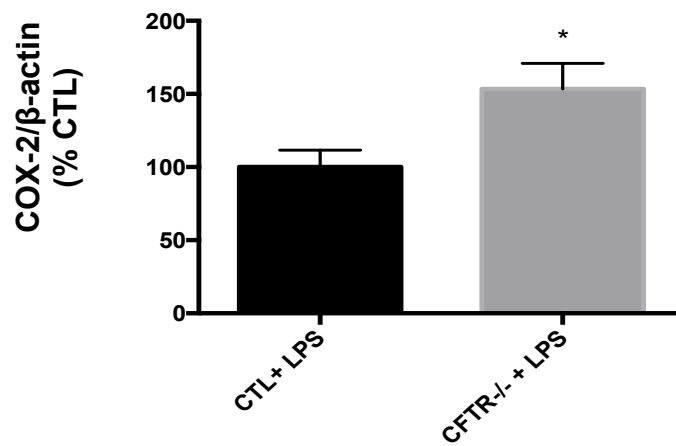
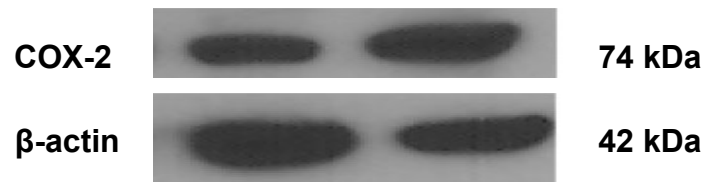
E

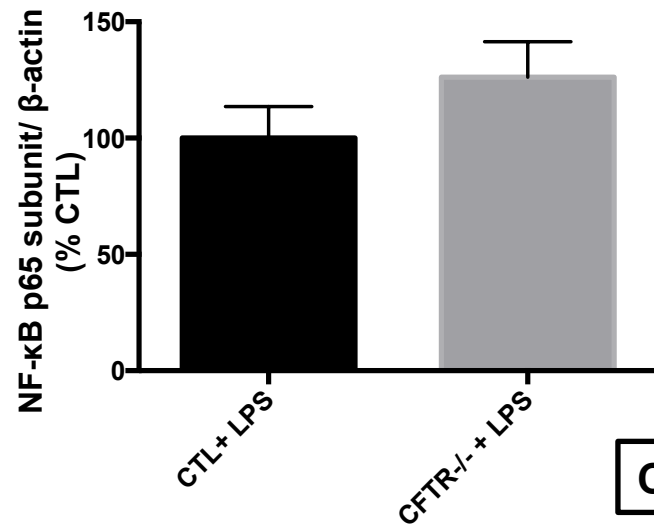
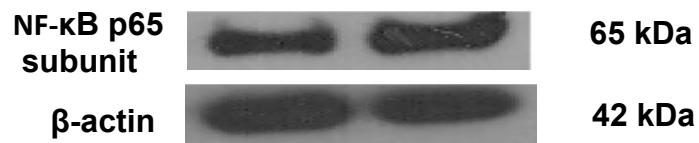
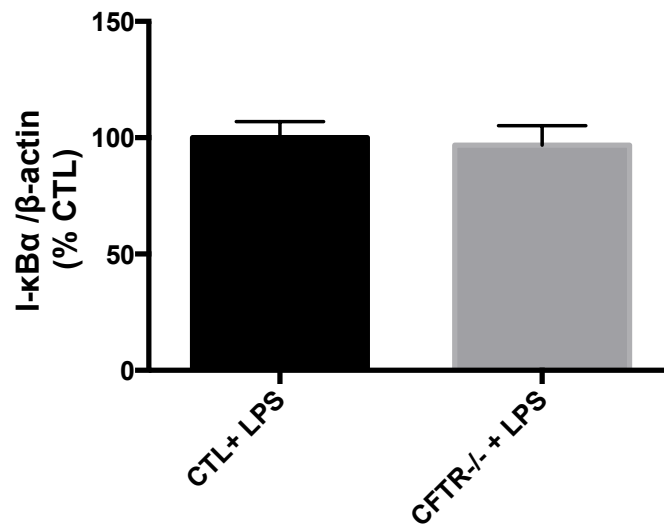
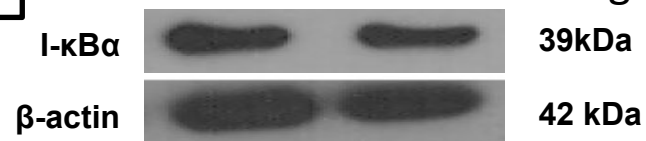
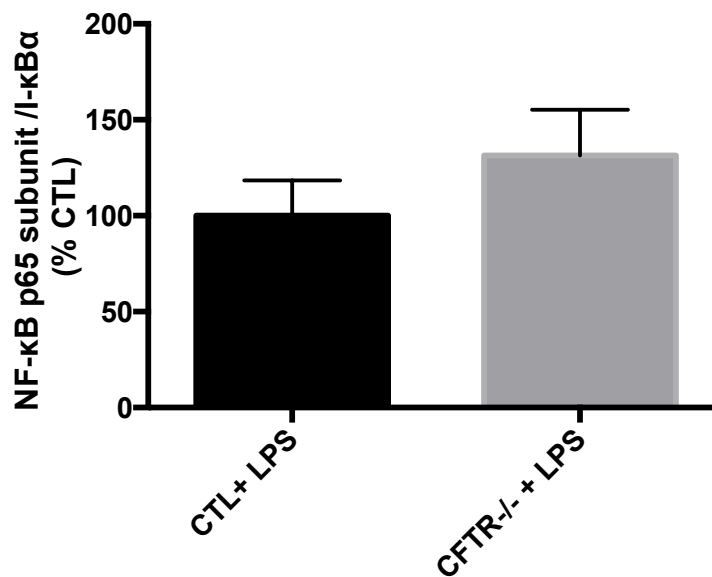


A**B****C**

A**B****C**



A**B****C**

A**B****C**

Article 3

CFTR deletion confers mitochondrial dysfunction and disrupts lipid homeostasis in intestinal epithelial cells.

Kleme ML^{1,2}, Sané AT², Garofalo C², Berthiaume Y³, Levy E^{1,2}

¹ Research Centre, CHU Sainte-Justine, 3175 Sainte-Catherine Road, Montreal, Quebec, Canada H3T 1C4, ² Department of Nutrition, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5 and ³ Montreal Clinical Research Institute, 110 des Pins Avenue, Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7

Key words: cystic fibrosis, fatty acid oxidation, OXPHOS, oxidative stress, apoptosis, lipid esterification, apolipoprotein biogenesis, lipoprotein secretion

Short title: Unraveling the regulatory role of CFTR in intestinal homeostasis

Address for correspondence: *Dr. Emile Levy
GI-Nutrition Unit
CHU Sainte-Justine Research Centre
3175 Ste-Catherine Road
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5
Tel: (514) 345-7783
E-mail: emile.levy@recherche-ste-justine.qc.ca

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is a genetic disease in which intestine exhibit oxidative and inflammatory characteristics. This pathology is also characterised by Essential Fatty Acid (EFA) deficiency. **Objectives:** As mitochondria is the main source and the main target of Reactive Oxygen Species (ROS), we hypothesized that CFTR defect leads to mitochondrial dysfunction that contribute to oxidative stress (OxS) and lipids intestinal metabolism disruption. **Methods.** Mitochondrial functions and lipids metabolism were investigated in intestinal epithelial Caco-2/15 cells with *CFTR* knockout. Experiments were performed under basal condition and after the treatment with the pro-oxidant iron-ascorbate (Fe/Asc) complex. Butylated Hydroxy Toluene (BHT) served as anti-oxidant. **Results:** Mitochondria of intestinal epithelial cells with *CFTR* knockout (*CFTR*^{-/-}), spontaneously showed an altered redox homeostasis characterised by an increase of H₂O₂ levels and a significant decrease of peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1-alpha (PGC-1 α) and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2). Consistent with that, 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) was weakly expressed. The disturbance of Fatty acid β -oxidation process was associated with a less expression of Carnitine Palmitoyl Transferase 1 (CPT1) and Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (LCAD). The significant decline of mitochondrial expression of cytochrome c and Bcl2 was in favor of apoptosis. Mitochondrial respiration was disrupted as demonstrated by a low expressions of respiratory complex and an high ADP/ATP ratio. In contrast, lipogenesis proteins such as Fatty Acid Synthase (FAS) and Acetyl CoA Carboxylase (ACC) were markedly increased. This expansion was associated with an important secretion of triglycerides (TG), Cholesteryl Ester (CE), phospholipids (PL), Chylomicrons, VLDL, LDL and HDL in basolateral medium. The cellular synthesis of Apo-B48 and ApoA-I were higher in *CFTR*^{-/-}. The addition of Fe/Asc worsened these disorders that were partially improved with BHT. **Conclusion:** *CFTR* silencing results in mitochondria dysfunction and lipids metabolism disruption in intestinal epithelial cells. More investigations are needed to elucidate the mechanisms underlying these disorders.

1 INTRODUCTION

Cystic Fibrosis (CF) is the most lethal genetic disease in Caucasians (Ravilly, Roux, bellis, & Dufour, 2007). It is due to mutations in the *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR)* gene, which encodes for the cAMP-activated Cl⁻ - and HCO₃⁻ - transporting channel expressed in epithelial cells of many organs (Storni, Claustres, Chinet, & Ravilly, 2001). This ATP-binding cassette transporter works not only as an essential anion regulator, but also participates actively in the fluidity of glandular secretions (Storni et al., 2001). In addition to facilitating the mobilization of native anionic substrates, CFTR promotes the transport of glutathione, the first line of cellular antioxidant defense. Glutathione reduced form (GSH or γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) is the most important actor in the control of thiol redox status (Biswas, Chida, & Rahman, 2006; Masella, Di Benedetto, Vari, Filesi, & Giovannini, 2005) and is involved in free radical scavenging, metal chelation and DNA protection (Nzengue, 2008). Many studies reported GSH deficiency in CF in association with fat intestinal malabsorption of antioxidant vitamins, thereby contributing to weak protection against oxidative stress (OxS) in CF. Moreover, OxS in CF may result from endoplasmic reticulum stress, airway chronic neutrophilia and impaired antioxidant defense because of intestinal malabsorption of fat-soluble vitamins (Back et al., 2004; Galli et al., 2012; Kleme & Levy, 2015; Oudshoorn et al., 2006; Tirouvanziam et al., 2006).

To OxS can be added inflammation and the two processes are recognized as major actors in CF pathophysiology in the lungs and pancreas (Fujimori et al., 2011; Meyerholz, Stoltz, Pezzulo, & Welsh, 2010; Petrov, 2010). Although inflammation is triggered by airway chronic infection and essential fatty acid (EFA) deficiency (leading to the raise of pro-inflammatory FA) (Chanson, 2009; Njoroge, Laposata, Katrangi, & Seegmiller, 2012; Strandvik, 2010), dysfunctional CFTR seems to be directly involved in the activation of macrophage, modulation of cytokine production, and stimulation of nuclear factor kappa B (NF- κ B), a powerful transcription factor endowed with the capacity of regulating many genes of innate and adaptive immunity, as well as inflammation (Baldwin, 2001).

The gastrointestinal tract of CF patients is often characterized by meconium ileus, distal intestinal obstruction, accumulation of viscous and sticky mucus, bacterial overgrowth, ileal hypertrophy and villous atrophy, augmented intestinal permeability, chronic diarrhea, fat malabsorption, reduced secretion of sodium bicarbonate, low duodenal pH, and bile acid precipitation (Reis & Damaceno, 1998). Despite these severe gastrointestinal manifestations, only a few groups of investigators have focused on the investigation of the processes of inflammation and OxS in the gut of CF subject. Our recent study has shown that CFTR deletion in intestinal Caco-2/15 cells resulted in a spontaneously weakened antioxidant defense in association with lipid peroxidation and inflammation (Kleme, Sane, Garofalo, & Levy, 2016). In addition, these differentiated cells were more sensitive to pro-oxidant and pro-inflammatory stimuli (Kleme et al., 2016). Unfortunately, the definitive mechanistic evidence of the link among the primary defect in CF and abnormalities in intestinal redox balance and susceptibility to inflammation has yet to be demonstrated. The purpose of the present work is to test the

following hypotheses: (i) as mitochondria are the primary cellular sources and sensitive targets of reactive oxygen species (Morel & Barouki, 1998), we surmise that *CFTR* deletion affects mitochondrial redox homeostasis; (ii) consequently, many mitochondrial functions may be disturbed, including respiration, FA oxidation, energy production and apoptosis; and (iii) conversely, cellular lipid synthesis and transport would be enhanced.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 *CFTR-knockout in Caco-2/15 cell line*

The *CFTR* deletion in Caco-2/15 cell line was generated by Zinc Finger Nuclease procedure as previously described (Kleme et al., 2016). Briefly, Intestinal Caco-2/15 cells were grown at 37°C with 95% humidity and 5% CO₂ in EMEM supplemented with 10% decomplemented foetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin and 1% non-essential amino acids (NEAA, all reagents from GIBCO- BRL, Grand Island, NY). At 95% confluence, according to the procedure provided by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), the cells were transfected with two ZFN plasmid constructs targeted to human *CFTR* gene (CKOZFN1722). These ZFNs bind to a specific locus on *CFTR* sequence and cause a double-strand break that is ultimately repaired in the cell by the process of non-homologous end joining to generate precisely targeted genomic edits resulting in cell lines with specific gene disruption. The integrity of cells was monitored by assessment of villin protein expression whereas differentiation was appreciated by the measurement of sucrase activity (Mailhot, Rabasa-Lhoret, Moreau, Berthiaume, & Levy, 2010; Precourt et al., 2012). The physical barrier function was characterised by transepithelial electric resistance measurement and occludin protein expression (Escaffit et al., 2006). The untransfected intestinal epithelial Caco-2/15 cells served as control.

2.2 *Cell culture*

Control (CTL) and *CFTR*-knockout (*CFTR*^{-/-}) Caco 2/15 cells were cultured at 37°C with 95% humidity and 5% CO₂, at a density of 5x10⁶ / petri dish containing 10 ml EMEM supplemented with 1% penicillin-streptomycin, 1% NEAA and 5% decomplemented foetal bovine serum. The culture medium was refreshed every three days and the cells were used fifteen days post confluence when they were highly differentiated and suitable for experiments.

2.3 *Induction of OxS*

Fifteen days post confluence, the CTL and *CFTR*^{-/-} Caco 2/15 cells were washed twice with PBS and incubated in serum-free EMEM supplemented with 1% penicillin-streptomycin and 1% NEAA for 18 hours in the presence or absence the antioxidant Butylated Hydroxy Toluene (BHT, 0.5 mM) (SIGMA). At the end of this incubation period (18h), the medium was removed and cells were cultured with a mixture of 200 µM Iron (II) sulphate heptahydrate (F8633-250G) and 2 mM ascorbate (A5960-100G) for 6 hours at 37°C to induce OxS. This strong oxygen radical-generating system was added to challenge cells and to evaluate their capacity to respond to an external pro-oxidant stimulus.

2.4 Isolation of mitochondria

At the term of the 6 hour-incubation, the medium was removed and cells were washed twice with cold PBS. They were then scraped in 1ml of sucrose buffer containing 0,25 M sucrose, 3 mM EDTA and 1 mM DTT pH 7,38. Cell suspensions were homogenized and mitochondria were isolated by differential centrifugation techniques according to our established techniques (Denis et al., 2015; Taha et al., 2010). The first centrifugation was carried out using a Beckman Coulter centrifuge (COL95A06) at 3300 RPM, 4°C for 10 minutes to sediment nuclei and cell debris. The supernatant was subsequently centrifuged at 10500 RPM to separate mitochondria. The mitochondrial pellet was then resuspended in sucrose buffer and used for further experiments. The protein content of the mitochondrial suspensions was determined by Bradford assay (BioRad, Mississauga, ON).

2.5 Protein expression analysis by immunoblotting

Protein samples (30 µg) were denatured for 10 min in a buffer containing SDS and mercaptoethanol. They were separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel according to protein molecular weights and electroblotted onto nitrocellulose or PVDF membranes. Defatted milk proteins were used to block nonspecific sites of the membranes before adding primary antibodies: rabbit polyclonal anti-PGC1 alpha (PGC1a and beta, 100 kDa, 1:1,000, Abcam, Cambridge, MA); rabbit anti-Nrf-2 (68 kDa, 1:1,000, Abcam, Cambridge, MA); rabbit polyclonal anti-OGG1 (39 kDa, 1:1,000, Novus biologicals); mouse anti-cytochrome c (15 kDa, 1:1,000, Novus biologicals); rabbit anti-AIF (67 kDa, 1:1,000, Abcam, Cambridge, MA), rabbit polyclonal anti-Bcl-2 (25 kDa, 1:1,000, Abcam Ab59348); rabbit monoclonal anti-Carnitine Palmitoyltransferase-1 A (CPT1A) (88 kDa, 1:1,000, Cell Signaling, Beverly, MA), rabbit polyclonal anti-long-chain Acyl-CoA dehydrogenase (LCAD) (45 kDa, 1:1,000, Thermo Scientific); Total OXPHOS Human WB antibody cocktail (CV 54 kDa, CIII 48 kDa, CII 29 kDa, CIV 22 kDa, CI 18 kDa , 1:250, Abcam, Cambridge, MA); mouse anti-β-actin (42 kDa, 1:250,000, Sigma); rabbit monoclonal anti- fatty acid synthase (FAS) C20G25 (273 kDa, 1:1,000, Cell Signaling); rabbit anti-Acetyl CoA carboxylase (ACC) 3662 (280kDa, 1:1,000, Cell signaling) . The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Expression of β-actin served as reference protein to confirm equal loading. Molecular size markers (BLUEye/PageRuler prestained protein ladder, Thermo scientific, Lithuania) were concomitantly loaded on gels. Blots were developed and the protein mass was quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and the UNSCAN- IT gel 6.1 software.

2.6 H₂O₂ assessment

H₂O₂ was quantified by fluorescence assay using the Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay kit (MAK165-1KT) (SIGMA Aldrich). Results were normalized according to the protein content of the mitochondria.

2.7 *β -oxidation of fatty acids*

Cells were rinsed twice with PBS (GIBCO) before being preincubated with serum-free EMEM for 1 h in flasks fitted with central wells, suspended through an air-tight rubber bung. Cells were supplemented with a solution containing 0,90 μ Ci U-[14 C]-palmitic acid (Perkin Elmer, 850 mCi/ mmol), 250 μ M unlabeled palmitic acid (SIGMA) and 2 ml serum-free EMEM and 10 μ l/ml of each anti-protease (PMSF, Leupeptin and Pepstatin) for 18 h while NaOH was added to each central well to trap released [14 C]-CO₂, and [14 C]-oxidized to [14 C]-CO₂ was measured as described by Montoudis et al. (Montoudis et al., 2008). Briefly, [14 C]-CO₂ was driven from medium by adding 300 μ l of 70% hydrochloric acid (1N) and trapped in the central well saturated with 10 x hyamine hydroxide. Flasks were shaken for a further 45 min at room temperature to increase trapping of [14 C]-CO₂, after which the center wells were placed in plastic vials, dark-adapted overnight, and assayed for radioactivity in a liquid scintillation counter.

2.8 *Measurement of ADP/ATP ratio*

ADP/ATP ratio was measured by bioluminescence assay using the Enzlight™ ADP/ATP ratio assay kit (ELDT-100) (Bioassay Systems) (Denis 2015). Results were normalized according to the protein content of the mitochondria.

2.9 *Lipid and lipoprotein assessment*

Specifically, for these experiments, cells were seeded at a density of 1×10^6 / well in six-well polycarbonate Transwell filter inserts plates (Costar Cambridge, MA) containing 2.5 ml of culture medium in the basolateral compartment and 1.5 ml in the apical one. Culture medium was refreshed every 3 days. Fifteen days after seeding, cells were washed twice with PBS and supplied with 2.5 ml serum-free EMEM in the basolateral chamber and 1.5 ml serum-free EMEM containing [BSA/oleic acid] (1:5, mol:mol, pH 7.4) in the apical chamber. BHT (0.5 mM) was added to serve as an antioxidant when needed. After 18 hours, the culture medium was discarded and replaced with fresh 2.5 ml serum-free EMEM and 1.5 ml radiolabeled [14 C] oleic acid (0.45 μ Ci) (53 mCi/mmol; Amersham, Oakville, ON, Canada) in the basolateral and the apical compartments, respectively. Fe/Asc (200 μ M/2 mM) with or without BHT (0.5mM) was added apically. After a 24 hour-incubation, media were collected from the two chambers and cells were washed twice with cold PBS and scraped in 1ml of lysis buffer (1X TBS, pH 7.4; 5 mM EDTA; 0.1 % SDS; 1% Triton X100; 0.5% Sodium deoxycholate) containing 10ul/ml of each anti-protease (PMSF, Leupeptin and Pepstatin).

Lipid extraction

Lipids were extracted from the basolateral medium with chloroform/methanol (v/v, 2:1). After overnight shaking at 4°C, saline was added and the samples were centrifuged (2500 rpm for 15 min). Then, the lower phase was evaporated. The esterified lipids from the precursor [14 C] oleic acid were separated by analytical thin layer chromatography (TLC) plates using the solvent mixture hexane-ether-acetic acid (80:20:3, vol/vol/vol). The area of triglycerides (TG), cholesteryl esters (CE) and phospholipids (PL) was scratched off the TLC plates and radioactivity contained in the silica powder was counted by scintillation counting (LS 5000 TD,

Beckman), using the scintillation liquid EcoLite (MP BIOMEDICALS, LLC). Results were expressed as dpm per milligram of cell protein which were quantified by the Bradford method (E. Levy, Garofalo, Rouleau, Gavino, & Bendayan, 1996; E. Levy et al., 1992; Mehran, Levy, Bendayan, & Seidman, 1997).

Lipid carrier

Postprandial plasma was used as carrier for Caco-2/15 cells lipoproteins. It was prepared from blood collected 3 h after the oral intake of a fat meal by a human volunteer. Enzyme activity inactivation was obtained after a 1h-incubation of the TG-enriched plasma at 56°C and in the presence of 3 anti-proteases (Pepstatin, Leupeptin, PMSF).

Isolation of Lipoproteins

Newly synthesized lipoproteins were isolated from the basolateral medium supplemented with anti-proteases and in which plasma lipid carrier was added (4:1, vol/vol). Isolation was performed by sequential ultracentrifugation using a TL-100 ultracentrifuge (Beckman) (E. Levy et al., 1992; Wilcox, Davis, & Heimberg, 1971). Briefly, the first ultracentrifugation (25000 rpm for 40min) led to chylomicron isolation. The lower phase was used to isolate successively very low-density lipoprotein (VLDL, 1.006 g/ml) and low-density lipoprotein (LDL, 1.063 g/ml at 100,000 rpm for 2.30 h with a tabletop ultracentrifuge 100.4 rotor at 4°C. Then, the density of LDL infranatant was adjusted to 1.21 g/ml before centrifuging at 100,000 rpm for 6.5 h to efficiently isolate high-density lipoprotein (HDL). Each lipoprotein fraction was exhaustively dialyzed at 4°C for 24 h into a solution contained 0.15M NaCl and 0.001M EDTA. The radioactivity incorporated into each lipoprotein was then assessed and reported as disintegrations per minute per milligram of cellular protein.

***De novo* apolipoproteins synthesis**

Apo synthesis and secretion were determined as described previously (E. Levy, Sinnett, et al., 1996). Briefly, Caco-2/15 cells were incubated for a period of 24 h with 67 µCi/ml of [³⁵S]-methionine in serum and methionine-free DMEM (GIBCO) containing NEAA and puromycin (2 µg/ml). After the incubation period, cells and basolateral medium were collected and antiproteases were added at a concentration of 1 mM. Cells were homogenized in the same lysis buffer as above. Excess amounts of antibodies against apos (Boehringer Mannheim) were added to cells along with A/G protein beads (Calbiochem, La Jolla, CA) and incubated overnight at 4°C. The immunoprecipitates were washed extensively with lysis buffer and analyzed on a 4–15% acrylamide gradient with a 3% stacking gel. Bands corresponding to all apos were excised off the gel and counted after an overnight incubation with 1 ml of BTS-450 (Beckman) and a 48 h-incubation in 10 ml of liquid scintillation fluid (Ready Organic, Beckman). Results are reported as the ratio of disintegrations per minute of apos per milligram of protein.

2.10 Statistical analysis

All values are expressed as mean ± SEM of at least 3 different experiments carried in triplicates. Data were analyzed by the two-tailed Student's *t* test or one-way ANOVA using PRISM 6.0

(GraphPad Software). The Difference were considered significant for P value < 0.05 .

3 RESULTS

Before initiating the series of planned experiments, we validated the effectiveness of ZFN to generate total *CFTR* suppression in Caco-2/15 cells. RT-PCR and Western blot confirmed the full deletion of *CFTR* gene and protein expression, respectively (data not shown). An examination was also carried out to ensure that the cell integrity was preserved following genetic manipulation. Confirmation was obtained by testing trypan blue exclusion, transepithelial resistance, sucrase activity, villin protein expression and occludin protein expression (Table 1).

3.1 Mitochondrial pro-oxidant and antioxidant defense

Since our previous studies demonstrated that the absence of functional *CFTR* in Caco-2/15 cells promoted exaggerated pro-oxidative response (Kleme et al., 2016), we directly evaluated the pro-oxidant status in mitochondria, which are considered as the central source of ROS in different organs (Morel & Barouki, 1998). Assessment of H_2O_2 showed increased levels in *CFTR*^{-/-} Caco-2/15 cells compared to controls (Fig.1A). Conversely, there was a significant decrease in the protein expression of NRF2, a critical transcription factor that upregulates the expression of many antioxidant genes (Fig.1B). In addition, *CFTR*^{-/-} Caco-2/15 cells exhibited a marked decline in the protein expression of 8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1, responsible for repair of ROS-induced DNA lesion in humans (Bhakat, Mokkaapati, Boldogh, Hazra, & Mitra, 2006) (Fig.1C) and in PGC1 α (the master mitochondrial biogenesis regulator and ROS suppressor) (Kukidome et al., 2006; Scarpulla, Vega, & Kelly, 2012) (Fig.1D). These results highlight the link between *CFTR* ablation and mitochondrial prooxidant/oxidant imbalance under basal conditions. A deterioration of these data was noted with the addition of Fe/Asc and the pre-incubation with BHT improved the level of some factors (Fig.1).

3.2 β - fatty acid oxidation

To test the impact of *CFTR* deletion on mitochondrial oxidative capacity, we incubated intestinal cells with [U-¹⁴C]-palmitic acid and, at the end of the incubation period, [14]-CO₂ production was estimated. As illustrated in Figure 2A, the catabolism of the labeled palmitate markedly decreased (36%, $p < 0.05$) in *CFTR*^{-/-} Caco-2/15 cells. Similarly, the *CFTR* deletion lowered [U-¹⁴C]-palmitate oxidation into [¹⁴C]-acid-soluble products (ASP) (22%, $p < 0.05$). In addition, cell treatment with Fe/Asc further reduced the β - fatty acid oxidation while the pre-incubation with BHT attenuated Fe/Asc-induced metabolite fall and to a lesser degree in *CFTR*^{-/-} cells (Fig. 2B).

These results prompted us to appraise the expression of CPT1A and LCAD since these proteins are rate-controlling enzymes in fatty acid β -oxidation. Our results demonstrated that under basal conditions CPT1A expression was lower in *CFTR*^{-/-} cells (43%, $p < 0.01$) than in CTL cells (100%, $p < 0.01$) (Fig. 3A). When Fe/Asc was added, the expression was further depressed while BHT clearly tended to restore CPT1A expression in CTL cells without the same amplitude in *CFTR*^{-/-} cells (Fig. 3A). Without any treatment, the protein expression of LCAD

in CFTR^{-/-} cells significantly declined (28%, $p < 0.01$) compared to CTL cells (100%, $p < 0.01$). Under pro-oxidant conditions triggered by Fe/Asc, LCAD expression was even more disadvantaged and BHT failed to re-establish it (Fig. 3B).

3.3 Oxidative phosphorylation

To determine whether the suppression of CFTR affects oxidative phosphorylation (OXPHOS), a central metabolic pathway in mitochondria, respiratory chain complexes were evaluated. Their protein expression examined by immunoblotting revealed a significant decrease of complex I (CI) (Fig. 4A), complex II (CII) (Fig. 4B), complex III (CIII) (Fig. 4C) and complex V (Fig 4E) in CFTR^{-/-} cells under basal conditions. Complex IV (CIV) expression was only slightly reduced (Fig. 4D). When Fe/Asc was added, the protein expression of all the complexes was further decreased particularly in CFTR^{-/-} cells compared to CTL cells (Figure 4). Pre-incubation of cells with BHT failed to normalize mitochondria respiratory chain complexes expression in both CFTR^{-/-} and CTL cells.

3.4 ADP/ATP ratio

As the major biological function of mitochondria is to generate cellular energy through fatty acid β -oxidation and oxidative phosphorylation, we measured ADP/ATP ratio. The results showed that CFTR^{-/-} cells spontaneously exhibited a significant raise in ADP/ATP ratio (Fig. 5). The ADP/ATP ratio was more increased (185 %, $p < 0.05$) in CFTR^{-/-} than in CTL cells (100% \pm 31).

3.5 Apoptosis-related proteins

Mitochondrial cytochrome c and Bcl-2 proteins usually serve to explore apoptosis. Our experiments demonstrated that, under basal conditions, the protein expression of cytochrome c (14%, $p < 0.01$) (Fig. 6A) and Bcl2 (77% $p < 0.01$) (Fig. 6B) in the mitochondria of CFTR^{-/-} cells was significantly lower than in CTL cells (100%, $p < 0.01$) (Fig 6). Fe/Asc administration led to deep decreases in Bcl2 protein expression particularly in CFTR^{-/-} cells. Pre-incubation of cells with BHT restored mitochondrial expression of especially Cyt c more in CTL cells than in CFTR^{-/-} cells.

3.6 Lipogenesis

As opposite regulation characterizes β -fatty acid oxidation and lipogenesis pathway, we examined the protein expression of lipogenic enzymes to test whether they are up-regulated in contrast with the down-regulated enzymes reported above in the fatty acid catabolic process. The results indeed revealed that, under basal conditions, fatty acid synthase (FAS) (165%, $p < 0.01$) and acetyl CoA carboxylase (ACC) (194%, $p < 0.05$) expression was more significantly increased in CFTR^{-/-} cells compared to CTL (Fig. 7A and 7B). Comparable differences between CFTR^{-/-} and CTL cells were noted in FAS and ACC in the presence of Fe/Asc. BHT addition was without marked effect on Fe/Asc-induced levels.

3.7 Lipid synthesis

In a second step, we challenged CTL and CFTR^{-/-} cells with oleic acid in order to evaluate their ability to synthesize lipids and lipoproteins in Caco-2/15 cells granting access to both sides of the bipolar intestinal epithelium. The results demonstrated that under basal conditions, the deletion of CFTR^{-/-} cells significantly raised the output of TG (644 %, p < 0.0001) (Fig. 8A), CE (108 %, p < 0.05) (Fig. 8B) and PL (53%, p < 0.01) (Fig.8C) in the basolateral medium. The addition of Fe/Asc led to a drop of lipid secretion in the two cell types. However, the export of lipids to the basolateral medium remained higher in CFTR^{-/-} cells (~5 fold of CTL values). On the other hand, BHT decreased lipid secretion, especially TG, in CFTR^{-/-} and CTL cells.

3.8 Lipoprotein production

As intestinal lipids are transported by lipoproteins, we investigated the impact of CFTR deletion on lipoprotein production. In accordance with the elevated levels, under basal conditions, CFTR^{-/-} cells were characterized by increased levels of chylomicrons (201%, p<0,0001) (Fig. 9A), VLDL (610 %, p<0,0001) (Fig. 9B), LDL (421%, p<0,0001) (Fig. 9C) and HDL (47 %, p<0,01) (Fig. 9D) compared to controls. The addition of Fe/Asc resulted in a slightly lowered secretion of lipoproteins while BHT further decreased their production.

3.9 Apolipoprotein biogenesis

Since apolipoproteins are important components of lipoproteins, their biogenesis was assessed following the incubation of CTL and CFTR^{-/-} cells with [³⁵S] methionine as a precursor. CFTR^{-/-} cells spontaneously synthesized Apo B48 (143 %, p<0,001) (Fig. 10A) and Apo A-I (151 %, p<0,01) (Fig. 10B) in higher quantities than CTL cells. If Fe/Asc lowered the de novo synthesis of Apo B-48, it remained without a significant effect on Apo A-I, but BHT intensified the synthesis in both cell types.

4 DISCUSSION

CFTR-mediated fluid secretion is necessary for appropriate intestinal physiology (Rowe, Miller, & Sorscher, 2005) and CFTR mutations lead to various intestinal manifestations (Sabharwal, 2016). The most prominent disorders in the CF gastrointestinal tract include intestinal obstruction, hyperpermeability, impaired secretion of mucus and bicarbonate, bacterial overgrowth, microflora changes, hyperacidity, dysmotility, and malignancies (De Lisle & Borowitz, 2013; Hedsund, Gregersen, Joensson, Olesen, & Krogh, 2012). The current data are consistent with and support the findings of our previous study demonstrating that the simple knockout of CFTR in intestinal epithelium causes redox disequilibrium (Kleme et al., 2016). More precisely, the present work was able to highlight the occurrence of OxS in mitochondria in link with mitochondrial dysfunction in response to intestinal CFTR depletion, which was underlined by the derangement of β - fatty acid oxidation, oxidative phosphorylation, energy production and amplified apoptosis. These disturbances were associated with the down-regulation of PGC1 α , a master regulator of mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism (Handschin & Spiegelman, 2006). Concomitantly, a significant stimulation was observed in lipogenesis, lipid synthesis, apolipoprotein biogenesis and lipoprotein production. Overall,

these original data demonstrate that CFTR deficiency influences multiple aspects of intestinal cellular and mitochondrial homeostasis.

Most cellular studies on the role of CFTR generally employed genetic manipulations that only partially reduce cellular CFTR expression. However, heterozygotes with a single CFTR mutation do not have CF, suggesting that partial loss of CFTR function could not contribute to the disease. Thus, the ZFN technique used in the present study represents a considerable advantage since it leads to the disruption of all *CFTR* transcripts and to the total depletion of the CFTR protein, which mimics the homozygous CF phenotype. Moreover, the genetic engineering was carried out in Caco-2/15 cells that undergo a spontaneous differentiation leading to the formation of a monolayer of cells expressing several morphological and functional characteristics of mature human enterocytes (Courtois et al., 2003). This remarkable intestinal model is not only regarded as the most convenient for the investigation of gut absorption and interactions (Mailhot et al., 2009), but it has been in our hands fully appropriate for the exploration of lipid/lipoprotein homeostasis, OxS and inflammation (Courtois et al., 2003; Precourt et al., 2012). Therefore, we are very confident that our experimental tools were fully optimal for the scrutiny of the modulatory role of CFTR in mitochondrial function.

ROS overproduction in CF is generally attributed to malabsorption of fat-soluble antioxidant vitamins (Back et al., 2004; Huang, Schall, Zemel, & Stallings, 2006; Oudshoorn et al., 2006), infection conditions (Day, van Heeckeren, Min, & Velsor, 2004), stimulation of NADPH oxidases through inflammation mediators (Day et al., 2004), and a constitutive defect of GSH metabolism (Naruse, 2002). However, our recent studies showed that the very fact of abrogating the *CFTR* gene expression in intestinal cells was sufficient to induce OxS and to increase susceptibility to pro-oxidants (Kleme et al., 2016). The results of the present work go beyond this knowledge since they underscore the impact of *CFTR* depletion on ROS generation in the mitochondria, the major sources of potentially harmful OxS (Cadenas & Davies, 2000; Finkel & Holbrook, 2000). A potential mechanism for the pro-oxidant action of CFTR^{-/-} in mitochondria could be through the noted down-regulation of PGC1 α , a key regulator of the gene expression of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) and catalase (St-Pierre et al., 2006). Furthermore, as PGC1 α modulates the antioxidant Keap1-Nrf2-ARE pathway (Scarpulla et al., 2012), its decreased expression in our experiments could have been behind the down-regulation of NRF2, a potent stimulator of oxidant scavenging systems. Although the fall of these powerful transcription factors may explain the mitochondrial imbalance of oxidants and anti-oxidants, additional work is needed to elucidate the underlying mechanisms for the interactions between CFTR and PGC1 α .

As evidenced by our observations, mitochondrial DNA integrity seemed affected given the drop of OGG1 protein expression in CFTR^{-/-} cells. OGG1 is the initiating enzyme of DNA base repairs. It catalyses the excision of 8-OH-deoguanosine, the common mutagenic form of oxidized guanine, from DNA. It has been demonstrated that the alteration of cellular redox leads to the inhibition of OGG1 activity (Bravard et al., 2006). Similarly, previous studies in our laboratory demonstrated the harmful effect of OxS on mitochondria DNA integrity, essentially caused by reduced OGG1 expression (Denis et al., 2015; Taha et al., 2010).

Therefore, the imbalance of oxidants and anti-oxidants in CFTR^{-/-} cells could be incriminated in the abnormally low OGG1 protein expression.

We provided evidence that CFTR deletion in intestinal epithelial cells provoked mitochondrial dysfunction as highlighted by the decline of beta-fatty acid oxidation, oxidative phosphorylation and ATP-linked respiration. The reduction in these major metabolic pathways may be explained by the down-regulation of PGC1 α , which represents a powerful activator of mitochondrial biogenesis, oxidative metabolism, and fatty-acid β -oxidation in many tissues (Finck & Kelly, 2006). Through its ability to coactivate numerous DNA-binding transcription factors, including nuclear respiratory factors PPAR α , and ERR α , it activates the expression of a core genetic program needed for mitochondrial function, DNA replication, and transcription (Arany et al., 2007; Handschin & Spiegelman, 2006; Lin et al., 2002). An example of the link for the regulation of the nuclear and mitochondrial genomes by PGC1 α is represented by the forced expression of PGC-1 α that dramatically increases mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism in certain tissues *in vivo* (Arany et al., 2007; Handschin & Spiegelman, 2006; Lin et al., 2002) whereas deletion of both PGC-1s has the opposite effect, severely limiting respiration in skeletal muscle or heart (Lai et al., 2008; Uldry et al., 2006; Zechner et al., 2010). For its part, NRF2 induces mitochondrial transcription factor (mtTFA) that translocates to mitochondria to govern mitochondrial DNA replication and transcription (Wu et al., 1999). All together, our data demonstrate that CFTR^{-/-} deletion leads to mitochondrial respiration, fatty-acid β -oxidation and energy production by mechanisms implicating PGC-1 α and NRF2.

Our experiments revealed the stimulation of lipogenic enzymes, lipid synthesis and lipoprotein production in Caco-2/15 cells with CFTR suppression. Although these data were intuitively expected given the depressed mitochondrial FA oxidation, the mechanisms remain unclear. Nevertheless, it should be noted that, in line of the present findings, a similar stimulatory trend was reported in previous studies using infection with short hairpin RNA interference-expressing lentiviruses, which suppressed the CFTR protein expression by 50% (Mailhot et al., 2009). Therefore, it is reasonable to propose that intestinal malabsorption is not due to CFTR genetic aberrations *in vivo*, which leads us to propose that factors other than defective CFTR are responsible for the abnormal intracellular events leading abnormal lipid transport in CF patients. The disturbing factors likely include exocrine pancreatic insufficiency, accumulation of viscous and sticky mucus, bacterial overgrowth, ileal hypertrophy and villous atrophy, augmented intestinal permeability, reduced secretion of sodium bicarbonate, low duodenal pH, and bile acid precipitation (Reis & Damaceno, 1998).

5 CONCLUSION

The current work provides a gathering body of evidence related to the role of CFTR in the preservation of mitochondrial dysfunction in enterocytes. Clearly, CFTR deficiency leads to dysfunction in mitochondrial energy metabolism as exemplified by the deterioration of FA β -oxidation, oxidative phosphorylation and ATP production in intestinal epithelial cells. The data

also highlight the adverse effects of CFTR deletion on the expansion of cellular lipogenesis and lipoprotein output. Although the findings pointed out the implication of OxS and robust transcription factors in the disruption of cellular and mitochondrial homeostasis, further studies are needed to delineate the responsible mechanisms.

FIGURES

Table 1: CFTR knockout and Caco-2/15 cell integrity

Viability Criteria	Control cells	CFTR ^{-/-} cells
Trypan Blue exclusion	> 96%	> 96%
Transepithelial resistance ($\Omega \times \text{cm}^2$)	1427	1380
Sucrase activity (UI/g proteins)	7.6	7.2
Villin protein expression (% of controls)	100 +/- 11	102 +/- 11
Occludin protein expression (% of controls)	100 +/- 6	105 +/- 5

Following CFTR silencing by the ZFN technique, Caco-2/15 cells were allowed to differentiate for 15 days. The cellular integrity was assessed using trypan blue exclusion (as a viability marker) and also by the determination of transepithelial resistance and occludin (as indicators of cell permeability and epithelial barrier function), as well as the expression of sucrase activity and villin protein mass (as markers of cell differentiation). Values are means \pm SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicate.

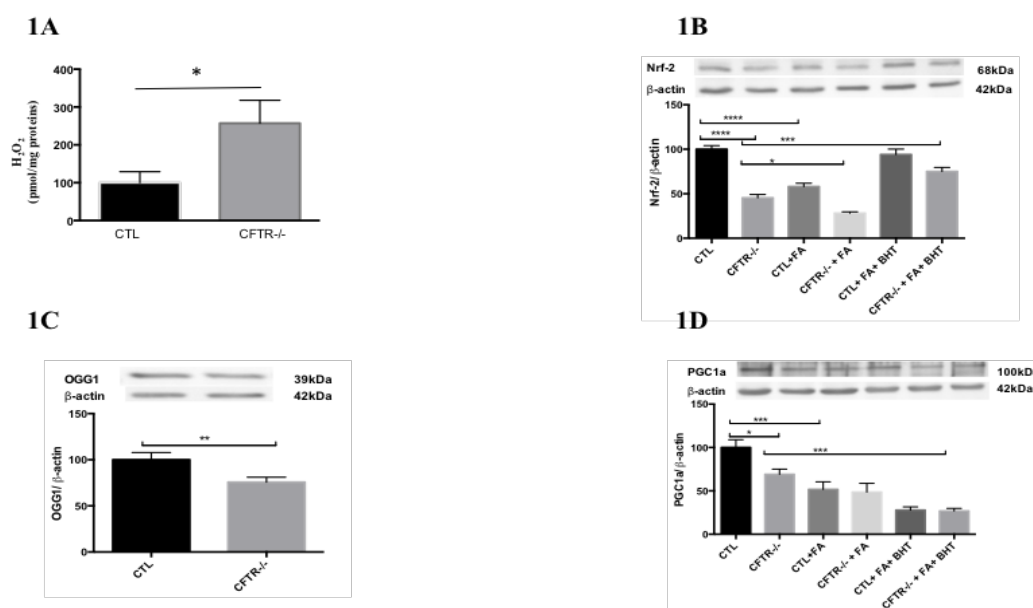


Figure 1

Figure 1: Impact of CFTR deletion on mitochondrial pro-oxidant and antioxidant defense in control (CTL) and CFTR^{-/-} cells.

After cellular differentiation, Caco-2/15 cells were trypsinized, harvested and homogenized. Protein mass of (A) nuclear factor (erythroid-derived 2) -like2 (Nrf2) and (C) *peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1-alpha* (PGC-1 α) was analyzed by Western blotting. Protein mass of (B) 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) as well as the

levels of H₂O₂ were quantified in mitochondrial pellet obtained after cell ultracentrifugation. Values are means ± SEM of 3-5 independent experiments, each done in triplicate.
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 2

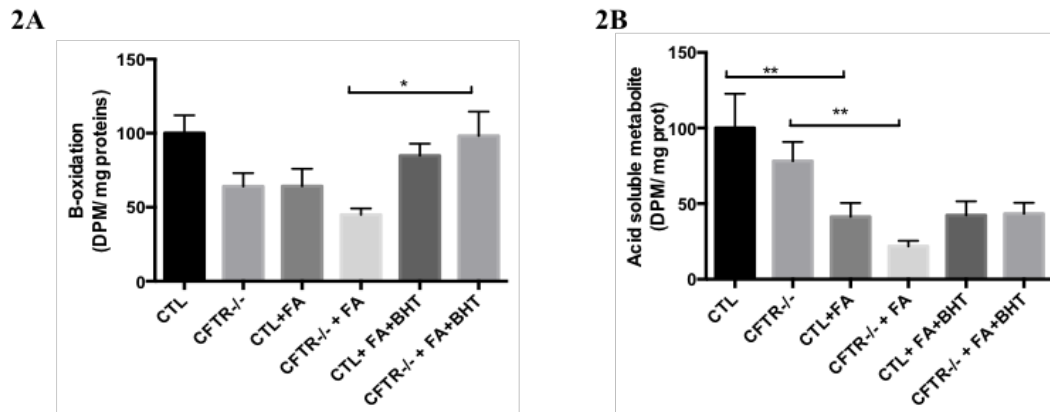


Figure 2: Influence of CFTR suppression on mitochondrial β -oxidation of fatty acid.

Caco-2/15 cells were allowed to differentiate until 15 days after confluence. Then, cells were trypsinized and challenged with palmitate. β -oxidation was monitored by quantification of (A) [¹⁴C]-oxidized to [¹⁴C]-CO₂ and (B) [¹⁴C]-acid-soluble products. Values are means ± SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 3

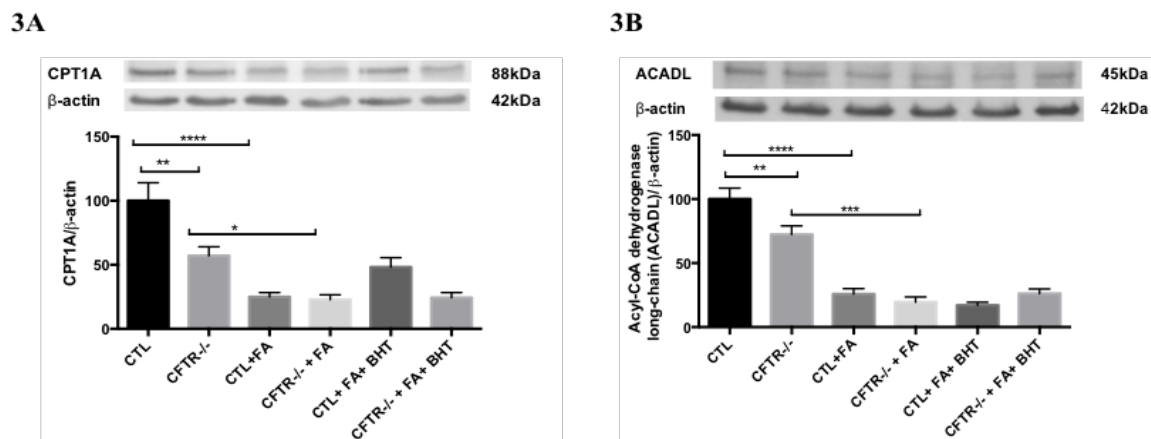


Figure 3: Effects of CFTR deletion on mitochondrial β -oxidation-related protein in control (CTL) and CFTR^{-/-} cells.

At the end of 15 days of differentiation, Caco-2/15 cells were trypsinized, harvested and homogenized. Protein mass of (A) carnitine palmitoyl transferase 1 A (CPT1A) and (B) long chain acyl-coA dehydrogenase (LCAD) was analyzed by Western blotting. Values are means ± SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicate.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 4

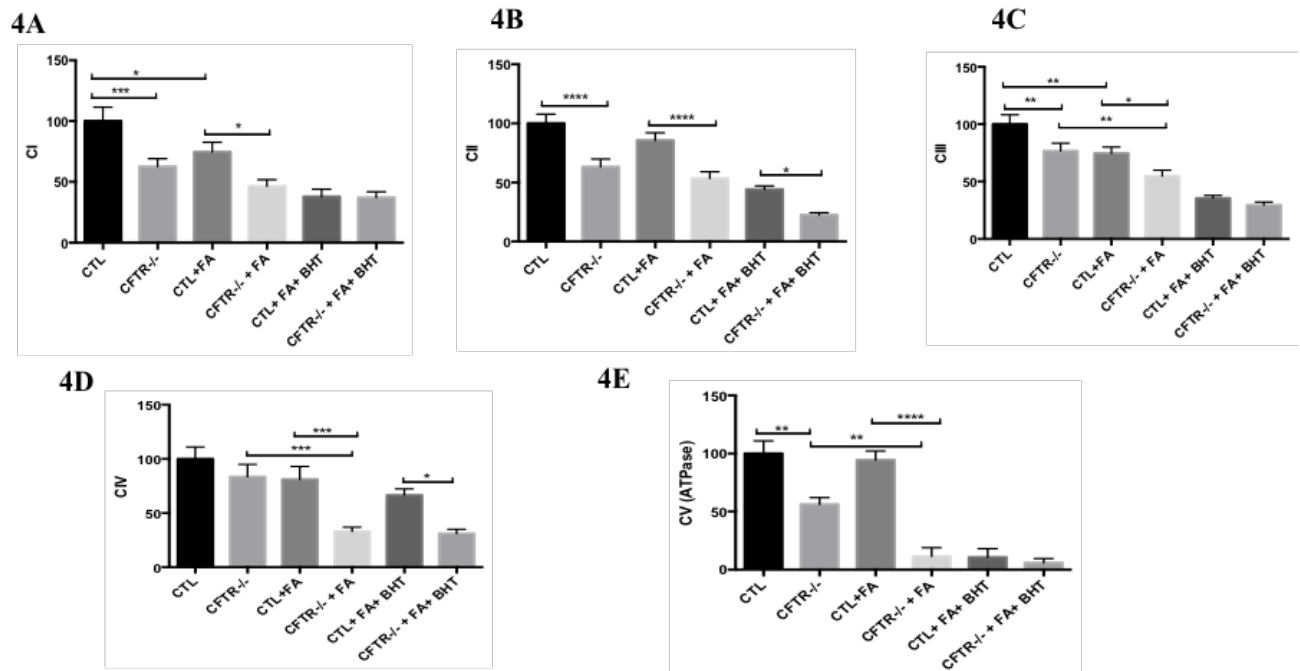


Figure 4: Effect of *CFTR* abrogation on mitochondrial oxidative phosphorylation

After 15 days of differentiation, Caco-2/15 cells were trypsinized and mitochondria were isolated by ultracentrifugation. Protein mass of respiratory chain (A) complex I (CI), (B) complex II (CII), (C) complex III (CIII), (D) complex IV (CIV) and (E) complex V (CV) was assessed by Western blotting. Values are means \pm SEM of 5 independent experiments, each performed in triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 5

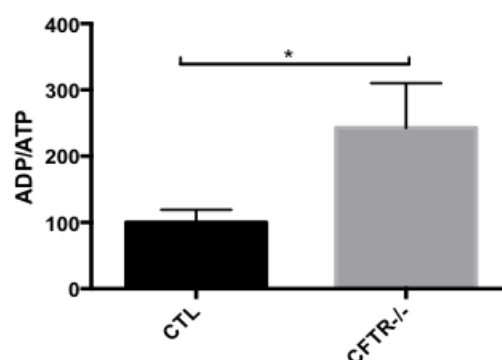
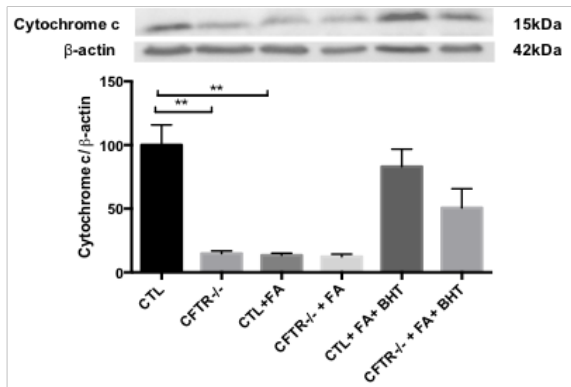
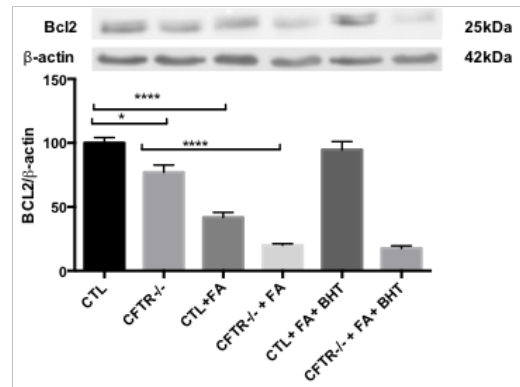


Figure 5: Effects of *CFTR* deletion on mitochondrial ADP/ATP ratio.

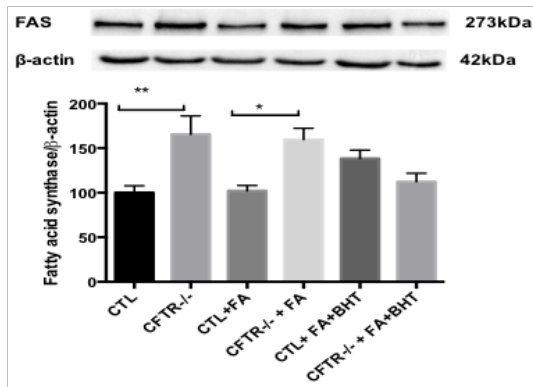
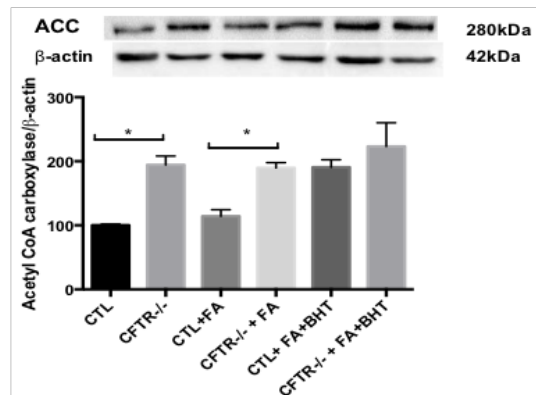
Caco-2/15 cells were allowed to differentiate until 15 days after confluence. Then, cells were trypsinized, harvested and homogenized. ADP/ATP ratio was measured by a bioluminescence assay. Values are means \pm SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicate.

* $P < 0.05$.

Figure 6**6A****6B****Figure 6: Impact of *CFTR* depletion on mitochondrial apoptosis-related proteins.**

Mitochondria were isolated from differentiated Caco-2/15 cells by ultracentrifugation. Then, protein mass of (A) cytochrome c and (B) B-cell lymphoma 2 (Bcl2) was quantified by Western blotting. Values are means \pm SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicate.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ vs.

Figure 7**7A****7B****Figure 7: Influence of *CFTR* deletion on cellular lipogenesis**

At the end of 15 days of differentiation, Caco-2/15 cells were trypsinized, harvested and homogenized. Protein mass of (A) fatty acid synthase (FAS) and (B) acetyl coA carboxylase was analyzed by Western blotting. Values are means \pm SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 8

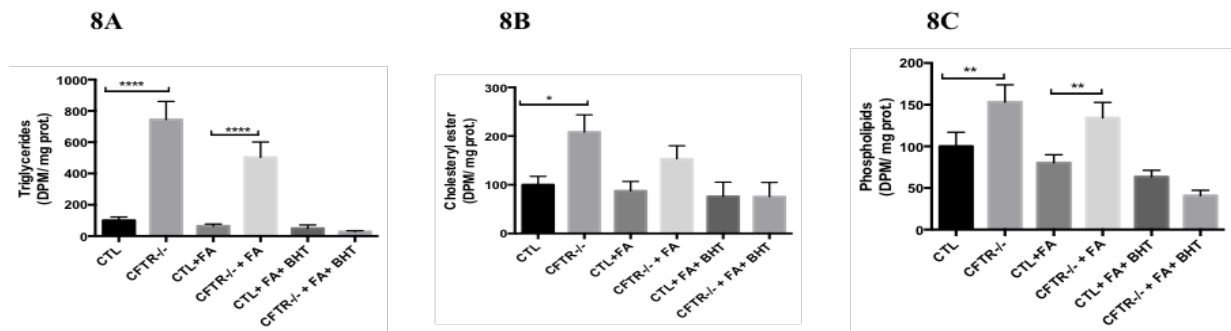


Figure 8: Impact of *CFTR* deletion on lipids synthesis in Caco-2/15 cells.

Caco-2/15 cells were allowed to differentiate until 15 days after confluence. Then, cells were challenged with [¹⁴C]-oleic acid. Lipids synthesis was assessed by quantification of (A) triglycerides (TG), (B) cholesteryl ester and (C) phospholipids (PL) in basolateral medium. Values are means ± SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicate.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$.

Figure 9

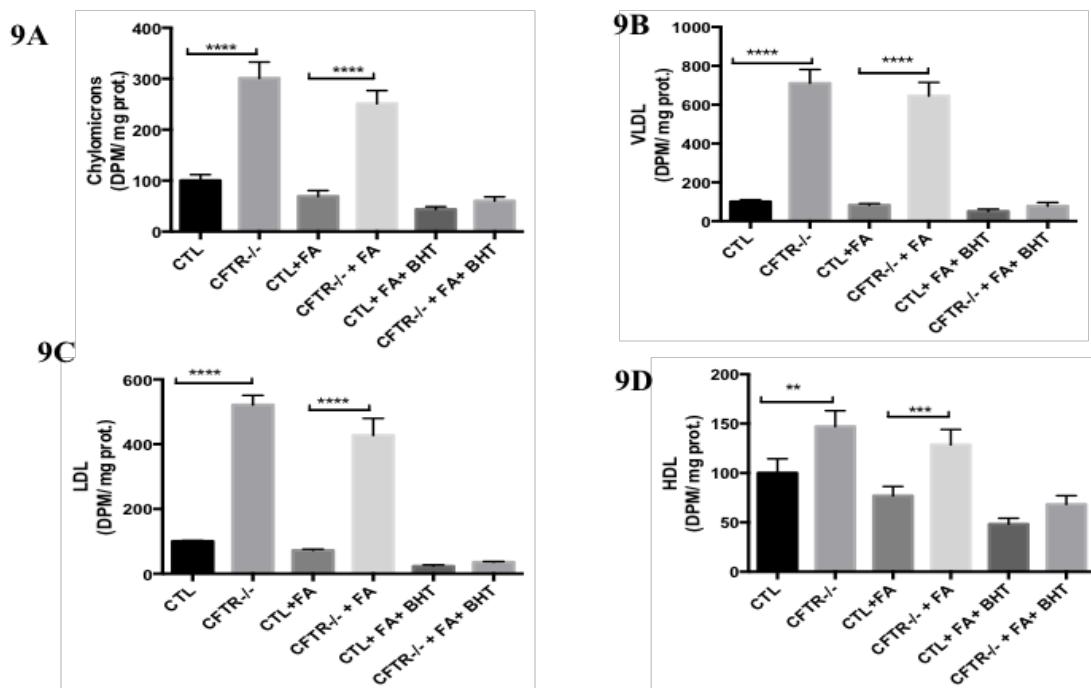


Figure 9: Influence of *CFTR* deletion on lipoprotein production in Caco-2/15 cells.

Caco-2/15 cells were allowed to differentiate until 15 days after confluence. Then, cells were challenged with [¹⁴C]-oleic acid. Lipoproteins production was assessed by quantification of (A) chylomicrons (CM), (B) very low-density lipoproteins (VLDL), (C) low-density lipoproteins and (D) high-density lipoproteins (HDL) in basolateral medium. Values are means ± SEM of 3

independent experiments, each performed in triplicate. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 10

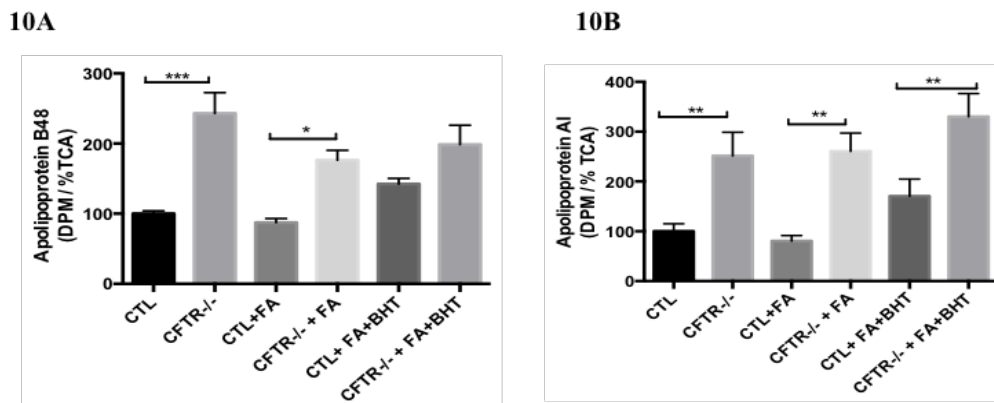


Figure 10: Influence of *CFTR* deletion on *de novo* apolipoproteins synthesis in Caco-2/15 cells.

At the end of 15 days of differentiation, Caco-2/15 cells were challenged with [³⁵S]-methionine. *De novo* apolipoproteins synthesis were assessed by the measurement of (A) apolipoprotein B-48 (Apo B-48) and (B) apolipoprotein A-I (Apo A-I) in cell lysate. Values are means \pm SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicate.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Acknowledgements

The authors thank Mrs. Schohraya Spahis for her technical assistance. The current work was supported by research grants from the Canadian Cystic Fibrosis Foundation (CFC-FKC-2388; CFC-FKC-3007) and the JA deSève Research Chair in nutrition (EL). The authors declare that no competing interests exist.

REFERENCES

- Arany, Z., Lebrasseur, N., Morris, C., Smith, E., Yang, W., Ma, Y., . . . Spiegelman, B. M. (2007). The transcriptional coactivator PGC-1 β drives the formation of oxidative type IIX fibers in skeletal muscle. *Cell Metab*, 5(1), 35-46. doi:10.1016/j.cmet.2006.12.003
- Back, E., Frindt, C., Nohr, D., Frank, J., Ziebach, R., Stern, M., . . . Biesalski, H. K. (2004). Antioxidant deficiency in cystic fibrosis: when is the right time to take action? *American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 11.
- Baldwin, A. S., Jr. (2001). Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest*, 107(1), 3-6. doi:10.1172/JCI11891
- Bhakat, K. K., Mokkapati, S. K., Boldogh, I., Hazra, T. K., & Mitra, S. (2006). Acetylation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by p300 and its role in 8-oxoguanine repair in vivo. *Mol Cell Biol*, 26(5), 1654-1665. doi:10.1128/MCB.26.5.1654-1665.2006
- Biswas, S., Chida, A. S., & Rahman, I. (2006). Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem Pharmacol*, 71(5), 551-564. doi:10.1016/j.bcp.2005.10.044
- Bravard, A., Vacher, M., Gouget, B., Coutant, A., de Boisferon, F. H., Marsin, S., . . . Radicella, J. P. (2006). Redox regulation of human OGG1 activity in response to cellular oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 26(20), 7430-7436. doi:10.1128/MCB.00624-06
- Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 29(3-4), 222-230.
- Chanson, M. (2009). mucoviscidose, déséquilibre en acides gras, céramides et radeaux membranaires. *Archives de pédiatrie*, 16, 543-545.
- Courtois, F., Seidman, G. E., Delvin, E., Asselin, C., Bernotti, S., Ledoux, M., & Levy, E. (2003). Membrane peroxidation by lipopolysaccharide and iron-ascorbate adversely affects Caco-2 cell function: beneficial role of butyric acid. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 7.
- Day, B. J., van Heeckeren, A. M., Min, E., & Velsor, L. W. (2004). Role for Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein in a Glutathione Response to Bronchopulmonary Pseudomonas Infection. *Infection and Immunity*, 72(4), 2045-2051. doi:10.1128/iai.72.4.2045-2051.2004
- De Lisle, R. C., & Borowitz, D. (2013). The cystic fibrosis intestine. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(9), a009753. doi:10.1101/cshperspect.a009753
- Denis, M. C., Desjardins, Y., Furtos, A., Marcil, V., Dudonne, S., Montoudis, A., . . . Levy, E. (2015). Prevention of oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction in the intestine by different cranberry phenolic fractions. *Clin Sci (Lond)*, 128(3), 197-212. doi:10.1042/CS20140210

- Escaffit, F., Pare, F., Gauthier, R., Rivard, N., Boudreau, F., & Beaulieu, J. F. (2006). Cdx2 modulates proliferation in normal human intestinal epithelial crypt cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 342(1), 66-72. doi:10.1016/j.bbrc.2006.01.128
- Finck, B. N., & Kelly, D. P. (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest*, 116(3), 615-622. doi:10.1172/JCI27794
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.
- Fujimori, N., Oono, T., Igarashi, H., Ito, T., Nakamura, T., Uchida, M., . . . Takayanagi, R. (2011). Vasoactive intestinal peptide reduces oxidative stress in pancreatic acinar cells through the inhibition of NADPH oxidase. *Peptides*, 32(10), 2067-2076. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2011.08.027>
- Galli, F., Battistoni, A., Gambari, R., Pompella, A., Bragonzi, A., Pilolli, F., . . . Working Group on Inflammation in Cystic, F. (2012). Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta*, 1822(5), 690-713. doi:10.1016/j.bbadis.2011.12.012
- Handschin, C., & Spiegelman, B. M. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev*, 27(7), 728-735. doi:10.1210/er.2006-0037
- Hedsund, C., Gregersen, T., Joensson, I. M., Olesen, H. V., & Krogh, K. (2012). Gastrointestinal transit times and motility in patients with cystic fibrosis. *Scand J Gastroenterol*, 47(8-9), 920-926. doi:10.3109/00365521.2012.699548
- Huang, S. H., Schall, J. I., Zemel, B. S., & Stallings, V. A. (2006). Vitamin E status in children with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency. *Journal of Pediatrics*, 148(4), 556-559.
- Kleme, M. L., & Levy, E. (2015). Cystic fibrosis-related oxidative stress and intestinal lipid disorders. *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(7), 614-631. doi:10.1089/ars.2014.6012
- Kleme, M. L., Sane, A. T., Garofalo, C., & Levy, E. (2016). Targeted CFTR gene disruption with zinc-finger nucleases in human intestinal epithelial cells induces oxidative stress and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*, 74, 84-94. doi:10.1016/j.biocel.2016.02.022
- Kukidome, D., Nishikawa, T., Sonoda, K., Imoto, K., Fujisawa, K., Yano, M., . . . Araki, E. (2006). Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes*, 55(1), 120-127.
- Lai, L., Leone, T. C., Zechner, C., Schaeffer, P. J., Kelly, S. M., Flanagan, D. P., . . . Kelly, D. P. (2008). Transcriptional coactivators PGC-1alpha and PGC-1beta control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. *Genes Dev*, 22(14), 1948-1961. doi:10.1101/gad.1661708

- Levy, E., Garofalo, C., Rouleau, T., Gavino, V., & Bendayan, M. (1996). Impact of essential fatty acid deficiency on hepatic sterol metabolism in rats. *Hépatology*, 23(4), 848-857. doi:10.1053/jhep.1996.v23.pm0008666341
- Levy, E., Garofalo, C., Thibault, L., Dionne, S., Daoust, L., Lepage, G., & Roy, C. C. (1992). Intraluminal and intracellular phases of fat absorption are impaired in essential fatty acid deficiency. *The American physiological society*(0193-1857/ 92), 8.
- Levy, E., Sinnett, D., Thibault, L., Nguyen, T. D., Delvin, E., & Menard, D. (1996). Insulin modulation of newly synthesized apolipoproteins B-100 and B-48 in human fetal intestine: gene expression and mRNA editing are not involved. *FEBS Lett*, 393(2-3), 253-258.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C. Y., Wu, Z., Boss, O., . . . Spiegelman, B. M. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, 418(6899), 797-801. doi:10.1038/nature00904
- Mailhot, G., Rabasa-Lhoret, R., Moreau, A., Berthiaume, Y., & Levy, E. (2010). CFTR depletion results in changes in fatty acid composition and promotes lipogenesis in intestinal Caco 2/15 cells. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, 5(5), e10446. doi:10.1371/journal.pone.0010446
- Mailhot, G., Ravid, Z., Barchi, S., Moreau, A., Rabasa-Lhoret, R., & Levy, E. (2009). CFTR knockdown stimulates lipid synthesis and transport in intestinal Caco-2/15 cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology*, 297(6), G1239-1249. doi:10.1152/ajpgi.00206.2009
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 16(10), 577-586. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.05.013
- Mehran, M., Levy, E., Bendayan, M., & Seidman, E. (1997). Lipid, apolipoprotein, and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 33(2), 118-128.
- Meyerholz, D. K., Stoltz, D. A., Pezzulo, A. A., & Welsh, M. J. (2010). Pathology of gastrointestinal organs in a porcine model of cystic fibrosis. *Am J Pathol*, 176(3), 1377-1389. doi:10.2353/ajpath.2010.090849
- Montoudis, A., Seidman, E., Boudreau, F., Beaulieu, J. F., Menard, D., Elchebly, M., . . . Levy, E. (2008). Intestinal fatty acid binding protein regulates mitochondrion beta-oxidation and cholesterol uptake. *J Lipid Res*, 49(5), 961-972. doi:10.1194/jlr.M700363-JLR200
- Morel, Y., & Barouki, R. (1998). Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *médecine/sciences*, 14, 9.

Naruse, S. (2002). cystic fibrosis and related diseases of the pancreas *Best practice and Research. Clinical gastroenterology*, 16 numéro 3, 511-526.

Njoroge, S. W., Laposata, M., Katrangi, W., & Seegmiller, A. C. (2012). DHA and EPA reverse cystic fibrosis-related FA abnormalities by suppressing FA desaturase expression and activity. *J Lipid Res*, 53(2), 257-265. doi:10.1194/jlr.M018101

Nzengue, Y. (2008). *Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53*. (Doctorat), Joseph Fournier, Grenoble, France.

Oudshoorn, J. H., Lecluse, A. L. Y., Berg, R. v. d., Wouter H.J. Vaes, Laag, J. v. d., & Houwen, R. H. J. (2006). Decreased Coenzyme Q10 Concentration in Plasma of Children with Cystic Fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 43, 5.

Petrov, M. S. (2010). Therapeutic implications of oxidative stress in acute and chronic pancreatitis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 13(5), 562-568. doi:<http://dx.doi.org/10.1097/MCO.0b013e32833b64b9>

Precourt, L. P., Marcil, V., Ntimbane, T., Taha, R., Lavoie, J. C., Delvin, E., . . . Levy, E. (2012). Antioxidative properties of paraoxonase 2 in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology*, 303(5), G623-634. doi:10.1152/ajpgi.00039.2012

Ravilly, S., Roux, E. L., bellis, G., & Dufour, F. (2007). Epidémiologie et physiopathologie de la mucoviscidose. *Revue francophone des laboratoires*, 397, 26-36.

Reis, F. J., & Damaceno, N. (1998). Cystic fibrosis. *J Pediatr (Rio J)*, 74 Suppl 1, S76-94.

Rowe, S. M., Miller, S., & Sorscher, E. J. (2005). Cystic Fibrosis. *The new england journal of medicine and Health*, 352, 10.

Sabharwal, S. (2016). Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 12(1), 43-47.

Scarpulla, R. C., Vega, R. B., & Kelly, D. P. (2012). Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 23(9), 459-466. doi:10.1016/j.tem.2012.06.006

St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jager, S., . . . Spiegelman, B. M. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, 127(2), 397-408. doi:10.1016/j.cell.2006.09.024

Storni, V., Claustres, M., Chinet, T., & Ravilly, S. (2001). Diagnostic de la mucoviscidose. *Archives pédiatriques*.

- Strandvik, B. (2010). Fatty acid metabolism in cystic fibrosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 83(3), 121-129. doi:10.1016/j.plefa.2010.07.002
- Taha, R., Seidman, E., Mailhot, G., Boudreau, F., Gendron, F. P., Beaulieu, J. F., . . . Levy, E. (2010). Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 cell line. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, 5(7), e11817. doi:10.1371/journal.pone.0011817
- Tirouvanziam, R., Conrad, C. K., Bottiglieri, T., Herzenberg, L. A., Moss, R. B., & Herzenberg, L. A. (2006). High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(12), 4628-4633.
- Uldry, M., Yang, W., St-Pierre, J., Lin, J., Seale, P., & Spiegelman, B. M. (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab*, 3(5), 333-341. doi:10.1016/j.cmet.2006.04.002
- Wilcox, H. G., Davis, D. C., & Heimberg, M. (1971). The isolation of lipoproteins from human plasma by ultracentrifugation in zonal rotors. *J Lipid Res*, 12(2), 160-172.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., . . . Spiegelman, B. M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98(1), 115-124. doi:10.1016/S0092-8674(00)80611-X
- Zechner, C., Lai, L., Zechner, J. F., Geng, T., Yan, Z., Rumsey, J. W., . . . Kelly, D. P. (2010). Total skeletal muscle PGC-1 deficiency uncouples mitochondrial derangements from fiber type determination and insulin sensitivity. *Cell Metab*, 12(6), 633-642. doi:10.1016/j.cmet.2010.11.008

Discussion et conclusion

La FK est une maladie génétique mortelle qui touche avec prédilection les Caucasiens. C'est une pathologie multisystémique dominée par ses manifestations respiratoires et digestives qui constituent d'importants facteurs de morbi-mortalité. L'intestin constitue un organe d'intérêt majeur dans la FK à cause de son implication dans divers aspects de la pathologie. Il représente avec le pancréas les deux organes ayant le plus grand nombre de transcrits du *CFTR* après la naissance. Son état dysfonctionnel est révélé très précocement au cours de la période néonatale sous la forme d'un iléus méconial qui constitue souvent la circonstance de découverte de la maladie. L'intestin participe au déséquilibre en AGE ainsi qu'au déficit en vitamines liposolubles du fait de la malabsorption intestinale. Ces deux anomalies, difficiles à juguler dans ce contexte, participent à la genèse du SOx et de l'inflammation.

L'implication de ces deux acteurs a été démontrée dans la physiopathologie des manifestations respiratoires et ils semblent découler directement de la mutation du *CFTR* (Verhaege, 2007). Leurs caractéristiques dans l'intestin, en lien avec le défaut génique, ont été moins étudiées malgré l'intérêt évident que cette exploration pourrait revêtir. En effet, les effets délétères du SOx sur les lipides membranaires et extra-membranaires étant bien connus (Haleng et al., 2007; St-Louis, 2011), leur implication dans la genèse du déséquilibre en AGE est probable. Vu le rôle clé de l'intestin dans le métabolisme des lipides, son exploration en regard du SOx et de l'inflammation pourrait également améliorer la compréhension des troubles lipidiques. En outre, la persistance des marqueurs du SOx malgré la variété de protocoles de supplémentation en antioxydants, suggère des investigations approfondies dont celle de la mitochondrie, organelle essentielle de l'homéostasie redox et du métabolisme énergétique. Les études relatives aux caractéristiques mitochondriales ont été entreprises dans les voies respiratoires. Cependant, les particularités du fonctionnement de cette organelle dans l'intestin de FK sont mal connues. Dans ce contexte, l'évaluation du SOx et de l'inflammation ainsi que des anomalies mitochondriales et du métabolisme des lipides, en lien avec le défaut du *CFTR* dans l'intestin, est apparue comme orientation objective pour la vérification de notre hypothèse de travail.

La lignée cellulaire Caco-2/15 a été sélectionnée comme un modèle cellulaire de choix parce qu'elle répond à plusieurs critères. En effet, elle est capable de se différencier spontanément en entérocytes matures polarisés possédant plusieurs propriétés morphologiques et fonctionnelles à l'instar des cellules épithéliales retrouvées dans le tube gastrointestinal humain. Dans notre laboratoire, cette lignée cellulaire a été efficacement utilisée pour étudier l'absorption intestinale, le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, le SOx et l'inflammation (Courtois et al., 2003; Mailhot et al., 2009). En outre, son adéquation aux manipulations géniques est démontrée (Precourt et al., 2009; Sane et al., 2006).

Évaluation du profil oxydatif et inflammatoire de l'intestin en l'absence du CFTR

Pour atteindre cet objectif, nous avons procédé à une délétion génique du *CFTR* dans les cellules épithéliales Caco-2/15 à l'aide du procédé innovateur Zinc Finger Nuclease (ZFN). Cette technique a permis d'obtenir une lignée cellulaire avec un knockout total du *CFTR* permettant ainsi de « simuler » les caractéristiques intestinales du patient homozygote pPhe508del. En effet, la mutation de classe II, la plus sévère connue à ce jour, se traduit par une absence de la protéine CFTR au pôle apical des cellules épithéliales exocrines (Pilewski & Frizzell, 1999). L'absence du gène et de la protéine CFTR a été confirmée respectivement par PCR semi-quantitative et par Western blot. Des études pilotes au laboratoire ont permis de valider la stabilité de l'absence du CFTR, dans des conditions diverses et ce sans détérioration de l'intégrité, de la différenciation et de la viabilité cellulaire. La FK étant transmise sous un mode autosomique et récessif, seuls les sujets homozygotes développent la maladie (Lowe et al., 1949). Ainsi, la génération de cette lignée cellulaire intestinale *CFTR*^{-/-} est apparue essentielle pour l'objectivité des résultats visés. Antérieurement à nos travaux, la délétion totale du *CFTR* a été réalisée chez la souris (Koehler et al., 2003), le cochon (Klymiuk et al., 2012; Meyerholz et al., 2010) et le furet (Sun et al., 2010). Ces modèles animaux ont été décrits comme étant adéquats aux investigations du tractus digestif. Les cellules Caco-2/15 non transfectées ont servi de contrôle (CTL).

L'évaluation du profil oxydatif des cellules CTL et CFTR^{-/-} s'est faite par la recherche des marqueurs de la peroxydation lipidique, notamment le malondialdéhyde (MDA), et par la mesure des activités enzymatiques antioxydantes endogènes (SOD1, SOD2, GPx et CAT). Nos résultats révèlent que la délétion du *CFTR* induit spontanément un SOx se traduisant par une augmentation du MDA et un effondrement de la GPx et de la CAT. Ces enzymes jouent un rôle déterminant dans la transformation de H₂O₂ en eau et en alcool stable (Garait, 2006) et leur déficience pourrait perturber sévèrement l'équilibre redox de la mitochondrie et de ce fait intensifier le stress. L'élévation du MDA et des 8-isoprostanes, associée à l'altération de la défense antioxydante est rapportée par plusieurs auteurs dans le plasma des patients de FK (Back et al., 2004; Laskowska-Klita & Chelchowska, 2001; Wood, Fitzgerald, & Garg, 2003; Lisa G. Wood et al., 2001). Cette vulnérabilité au SOx est encore plus évidente lorsque les cellules sont soumises au Fe /Asc, puissant inducteur exogène du SOx. En effet, les cellules CFTR^{-/-} génèrent plus de MDA et la dépression des activités des enzymes antioxydantes est plus marquée.

Le profil inflammatoire a été caractérisé *via* l'expression protéique de NF-κB et de son inhibiteur I-κBα. L'activation intrinsèque de ce facteur de transcription a été proposée comme étant la voie principale de l'inflammation dans les voies respiratoires (Verhaege, 2007). Nos résultats démontrent que la délétion du *CFTR* conduit à une élévation significative et spontanée du NF-κB. En outre, les cytokines dont la transcription génique découle de la voie du NF-κB telles que TNF-α et IL-6 sont également augmentées. Il en est de même pour COX-2, enzyme impliquée dans la réponse au SOx et activée par cette voie. La présence marquée de ces cytokines a été rapportée par des études précédentes (Heeckeren et al., 1997; Reinecker et al., 1993; Resta-Lenert & Barrett, 2002). La réponse des cellules CFTR^{-/-} au LPS, inducteur exogène de l'inflammation, est plus marquée comme le témoigne la hausse significative des cytokines inflammatoires. Cette réponse intense traduite par une forte production de TNF-α a été rapportée dans des macrophages alvéolaires de FK soumis au LPS du *Pseudomonas aeruginosa* (Pfeffer 1993).

Nos résultats sont en faveur de l'existence d'un lien direct entre le défaut du *CFTR* et le profil oxydatif et inflammatoire. Certains auteurs suggèrent que la protéine CFTR soit un régulateur négatif du NF-κB *via* son action sur le canal ENAC, ou encore qu'il soit impliqué dans la

différenciation de cellules sécrétrices, inhibitrices de l'expression des cytokines inflammatoires (Cohen & Larson, 2005; Lebowitz et al., 2004). D'autres désignent comme point de départ le stress du RE suite à la séquestration des protéines mal repliées. Ce stress favoriserait une fuite calcique, la production des ROS, puis l'activation de NF- κ B et de la PLA2 entraînant la sortie de l'AA (F. Antigny et al., 2008; Lai et al., 2007; Moore-Gagné, 2012).

Notre intérêt s'est plutôt porté sur la mitochondrie pour trois raisons : la première est son rôle déterminant dans le maintien de l'homéostasie redox qui influence également les processus inflammatoires. En effet, le SOx est décrit comme un activateur du NF- κ B et de l'AP-1 et il influence également la sortie de l'AA précurseur essentiel des éicosanoïdes au niveau des membranes cellulaires (Cantin et al., 2007; Hansen et al., 2006). La deuxième est l'impact du SOx sur l'homéostasie lipidique dont la perturbation est bien connue dans la FK (Nzengue, 2008). La troisième est la description antérieure des irrégularités mitochondriales potentiellement oxydatives dans les poumons de FK (Fabrice Antigny et al., 2009).

Caractéristiques mitochondriales en l'absence de *CFTR*

Les caractéristiques de la mitochondrie ont été évaluées en explorant l'intégrité de son ADN, son profil apoptotique, les processus de β -oxydation et de phosphorylation oxydative puis les facteurs de transcription PGC1 α et Nrf2.

Nos résultats démontrent que la délétion du CFTR induit systématiquement des dommages de l'ADN, une susceptibilité à l'apoptose, une altération du métabolisme énergétique caractérisée par la baisse de la β -oxydation, de la phosphorylation oxydative et de la production de l'ATP. Ces résultats sont similaires à ceux induits par le SOx dans les cellules intestinales (Taha et al., 2010) et plusieurs critères dans notre contexte sont en faveur d'une origine oxydative de ces désordres.

La faible expression de PGC1 α et de Nrf2 dans notre modèle cellulaire témoigne de l'altération de leurs fonctionnalités. PGC1 α est un régulateur par excellence de la biogénèse mitochondriale, du métabolisme oxydatif et de la β -oxydation dans plusieurs tissus (Finck & Kelly, 2006). Il régule le système de défense contre les ROS en augmentant les enzymes intervenant dans leur détoxification (Kukidome et al., 2006; Valle et al., 2005). Ce système de défense comprend les

protéines découplantes UCP2 et UCP3, ainsi que les enzymes anti-oxydantes SOD1, SOD3, la CAT et la GPx(St-Pierre et al., 2006) . Il intervient également dans la réplication de l'ADN et dans la transcription des composants de la chaîne respiratoire via son interaction avec Nfr2 (Scarpulla et al., 2012). Le déficit en GPx et en CAT pourrait ainsi résulter en partie de l'altération de PGC1 α et contribuer au déséquilibre redox de la mitochondrie par le défaut de transformation du H₂O₂. Cette persistance de H₂O₂ est favorable à la synthèse d'OH \cdot par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss. Le radical OH \cdot possède un fort pouvoir oxydatif sur les acides gras polyinsaturés et est impliqué dans l'activation des caspases (Kehrer, 2000).

Nos résultats démontrent que les dysfonctions mitochondriales découlant spontanément de la délétion du *CFTR* pourraient être en lien avec une altération du facteur de transcription PGC1 α . la mitochondrie serait donc un acteur de la genèse du SO_x et de l'inflammation dans ce contexte.

Métabolisme des lipides en l'absence de *CFTR*

L'évaluation du métabolisme lipidique a consisté en une exploration des enzymes de la lipogénèse, de la synthèse des lipides, de la production des lipoprotéines. Nos résultats démontrent que la délétion du *CFTR* induit une intensification de la lipogénèse comme le démontre l'expression marquée de FAS et d'ACC. La synthèse et la sécrétion des lipides (TG, CE, PL) et lipoprotéines (CM, VLDL, LDL, HDL) est significativement plus marquée dans les cellules *CFTR*^{-/-}.

Des études précédentes conduites dans notre laboratoire avaient révélé le même profil lipidique (Mailhot et al., 2009). Leur réalisation dans un modèle de cellules Caco-2/15 avec une invalidation seulement de 50% pour le *CFTR* avait suggéré que la présence partielle du *CFTR* conférant un profil « hétérozygote » pouvait justifier cet état de fait. La conduite de l'expérimentation sur un modèle totalement dépourvu de *CFTR* confirme que les dysfonctions lipidiques telles que rapportées chez le patient de FK, ne découlent pas du défaut génique. Elles semblent être la résultante de l'effet conjoint des anomalies du mucus, de la pullulation microbienne dans la lumière intestinale, de l'hypertrophie iléale et de l'atrophie des villosités, de l'hyperperméabilité intestinale, des dysfonctions pancréatiques et hépatobiliaire (Reis & Damaceno, 1998).

Conclusion

Le CFTR joue un rôle capital dans le maintien de l'homéostasie redox et inflammatoire. Sa défectuosité conduit à des dysfonctions de la mitochondrie en lien avec une perturbation du facteur de transcription PGC1 α impliqué dans sa biogénèse et dans l'activation du système de défense antioxydante. Les altérations qui en découlent contribuent à entretenir le SOx et l'inflammation tout en retentissant sur le métabolisme énergétique. Les anomalies lipidiques rapportées dans cette pathologie semblent résulter de l'intrication de diverses altérations mécanistiques.

Limites de l'étude

Ce travail a été réalisé sur un modèle cellulaire dépourvu du gène et de la protéine CFTR. Ainsi les conséquences pathologiques potentiellement liées à la présence du gène muté, à l'accumulation de protéines défectueuses dans le RE ou encore à la présence de protéines non fonctionnelles au pôle apical n'ont pu être investiguées. En outre ce modèle bien qu'il ait été optimal pour l'étude des mécanismes physiopathologiques visés n'est pas en mesure de reproduire les interactions entre les différents organes telles que retrouvées dans les modèles *in vivo* et chez l'humain. Ces interactions déterminent l'équilibre homéostatique.

Perspectives

Les conclusions de ce travail suggèrent :

- La surexpression du gène *CFTR* dans ce modèle cellulaire afin d'évaluer le degré de correction des anomalies en lien avec sa délétion.
- Des études plus approfondies sur la mitochondrie notamment le recours à des antioxydants à action intra-mitochondriale tels que le CoQ10. Leur impact sur le profil oxydatif et inflammatoire de l'intestin pourra être comparé à celui des antioxydants usuels. Par ailleurs, certaines familles d'antioxydants en particulier celles des

polyphénols dont l'action antiinflammatoire intestinale est démontrée pourrait faire l'objet d'expérimentation sur ce modèle.

- La conduite de ces expériences sur un modèle *in vivo* permettrait de confirmer les résultats obtenus et d'identifier d'autres mécanismes impliqués dans la genèse du SOx et de l'inflammation.
- L'élaboration et la conduite d'études cliniques de supplémentation en antioxydants intramitochondriaux permettrait d'évaluer leur impact sur le profil métabolique, clinique et biologique des patients comparativement aux antioxydants usuels (complexes vitaminiques) utilisés dans les études précédentes.

Bibliographie

- Allen, R. G., & Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med*, 28(3), 463-499.
- Allmann, D. W., Hubbard, D. D., & Gibson, D. M. (1965). Fatty acid synthesis during fat-free refeeding of starved rats. *Journal of Lipid Research*, 6(1), 63-74.
- Alton, E. W., Armstrong, D. K., Ashby, D., Bayfield, K. J., Bilton, D., Bloomfield, E. V., . . . Calcedo, R. (2015). Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(9), 684-691.
- Amaral, M. D., & Kunzelmann, K. (2007). Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Trends Pharmacol Sci*, 28(7), 334-341. doi:10.1016/j.tips.2007.05.004
- Anant, S., & Davidson, N. O. (2001). Molecular mechanisms of apolipoprotein B mRNA editing. *Current Opinion in lipidology*, 12, 7.
- Andersen, D. H. (1938). Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. *American journal of Diseases of Children*, 56(2), 344-399.
- Andersson, C., Al-Turkmani, M. R., Savaille, J. E., Alturkmani, R., Katrangi, W., Cluette-Brown, J. E., . . . Freedman, S. D. (2008). Cell culture models demonstrate that CFTR dysfunction leads to defective fatty acid composition and metabolism. *J Lipid Res*, 49(8), 1692-1700. doi:10.1194/jlr.M700388-JLR200
- Anesti, V., & Scorrano, L. (2006). The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*, 1757(5-6), 692-699. doi:10.1016/j.bbabi.2006.04.013
- Antigny, F., Girardin, N., Raveau, D., Frieden, M., Becq, F., & Vandebrouck, C. (2009). Dysfunction of mitochondria Ca²⁺ uptake in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Mitochondrion*, 9(4), 232-241.
- Antigny, F., Norez, C., Becq, F., & Vandebrouck, C. (2008). Calcium homeostasis is abnormal in cystic fibrosis airway epithelial cells but is normalized after rescue of F508del-CFTR. *Cell Calcium*, 43(2), 175-183. doi:10.1016/j.ceca.2007.05.002

Arnér, E. S. J., & Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 267, 8.

Aust, A. E., & Eveleigh, J. F. (1999). Mechanisms of DNA oxidation. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222(3), 246-252.

Aw, T. Y. (2005). Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicol Appl Pharmacol*, 204(3), 320-328. doi:10.1016/j.taap.2004.11.016

Back, E., Frindt, C., Nohr, D., Frank, J., Ziebach, R., Stern, M., . . . Biesalski, H. K. (2004). Antioxidant deficiency in cystic fibrosis: when is the right time to take action? *American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 11.

Ballatori, N., Krance, S. M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., & Hammond, C. L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological Chemistry*, 390(3), 191-214. doi:<http://dx.doi.org/10.1515/BC.2009.033>

Ballatori, N., & Rebbeor, J. F. (1998). Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione. *Seminars in Liver Disease*, 18(4), 377-387.

Bass, R., Ruddock, L. W., Klappa, P., & Freedman, R. B. (2004). A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. *J Biol Chem*, 279(7), 5257-5262. doi:10.1074/jbc.M304951200

Beguel, J. P., Huvet, A., Quillien, V., Lambert, C., & Fabioux, C. (2013). Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 157(1), 63-71. doi:10.1016/j.cbpc.2012.10.004

Bell, S. C. (2015). A new phase of CFTR treatment for cystic fibrosis? *Lancet Respir Med*, 3(9), 662-663. doi:10.1016/S2213-2600(15)00282-9

Belli, D. C., Levy, E., Darling, P., Leroy, C., Lepage, G., Giguère, R., & Roy, C. C. (1987). Taurine Improves the absorption of a fat meal in patients with Cystic Fibrosis. *Pediatrics*(0031 4005), 9.

Bettaieb, A. (2009). *Mécanismes d'induction de l'apoptose par le choc thermique et effet protecteur de la thermotolérance induite à 40° C*. Université du Québec à Montréal.

Bickel, M. (1993). The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol*, 64(5 Suppl), 456-460.

- Biswas, S., Chida, A. S., & Rahman, I. (2006). Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem Pharmacol*, *71*(5), 551-564. doi:10.1016/j.bcp.2005.10.044
- Blattner, C., Kannouche, P., Litfin, M., Bender, K., Rahmsdorf, H. J., Angulo, J. F., & Herrlich, P. (2000). UV-Induced stabilization of c-fos and other short-lived mRNAs. *Mol Cell Biol*, *20*(10), 3616-3625.
- Bleazard, W., McCaffery, J. M., King, E. J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., . . . Shaw, J. M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Cell Biology*, *1*, 7.
- Bloom, D., Dhakshinamoorthy, S., & Jaiswal, A. K. (2002). Site-directed mutagenesis of cysteine to serine in the DNA binding region of Nrf2 decreases its capacity to upregulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Oncogene*, *21*(14), 2191-2200.
- Blouin, J.-M., Chaves, V. E., Bortoli, S., & Forest, C. (2006). Effet des acides gras sur l'inflammation et le cancer. *OCL*, *13* (5), 6. doi:10.1684/ocl.2006.0046
- Bogardus, C. (1996). A Polymorphism in the Human Intestinal Fatty Acid Binding Protein Alters Fatty Acid Transport across Caco-2 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(18), 10892-10896. doi:10.1074/jbc.271.18.10892
- Boldogh, I. R., & Pon, L. A. (2006). Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*, *1763*(5-6), 450-462. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.02.014
- Bonnet, A. (2013). *Activation de la voie NF-κB par les protéines Tax des HTLV: Rôles des modifications post-traductionnelles et de la localisation de Tax*. Citeseer.
- Bosch, B., & De Boeck, K. (2016). Searching for a cure for cystic fibrosis. A 25-year quest in a nutshell. *Eur J Pediatr*, *175*(1), 1-8. doi:10.1007/s00431-015-2664-8
- Boucher, R. C., Stutts, M. J., Knowles, M. R., Cantley, L., & Gatzky, J. T. (1986). Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest*, *78*(5), 1245-1252. doi:10.1172/JCI112708
- Bours, V., Dejardin, E., Bonizzi, G., Merville, M.-P., & Piette, J. (1998). Le facteur transcriptionnel NF-κB: rôle au cours de l'oncogenèse et de la réponse au traitement anticancéreux.

Brodlie, M., McKean, M. C., Johnson, G. E., Anderson, A. E., Hilkens, C. M. U., Fisher, A. J., . . . Ward, C. (2011). Raised interleukin-17 is immunolocalised to neutrophils in cystic fibrosis lung disease. *European Respiratory Journal*, 37(6), 1378-1385. doi:<http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00067110>

Bronsveld, I., Mekus, F., Bijman, J., Ballmann, M., de Jonge, H. R., Laabs, U., . . . Tummler, B. (2001). Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of Delta F508 homozygous twins and siblings. *J Clin Invest*, 108(11), 1705-1715. doi:10.1172/JCI12108

Brosnan, J. T., & Brosnan, M. E. (2006). The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. *The journal of nutrition*, 136 (6suppl), 5.

Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 29(3-4), 222-230.

Calder, P. C. (2002). Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc*, 61(3), 345-358.

Canada, F. k. (2013). Le registre canadien sur la fibrose kystique. 36.

Canada, F. k. (2017). Qu'est ce que la fibrose kystique? Retrieved from <http://www.fibrosekystique.ca/about-cf>

Cantin, A. M., White, T. B., Cross, C. E., Forman, H. J., Sokol, R. J., & Borowitz, D. (2007). Antioxidants in cystic fibrosis. Conclusions from the CF antioxidant workshop, Bethesda, Maryland, November 11-12, 2003. *Free Radic Biol Med*, 42(1), 15-31. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.022

Caro, A. A., & Cederbaum, A. I. (2007). Role of intracellular calcium and phospholipase A2 in arachidonic acid-induced toxicity in liver cells overexpressing CYP2E1. *Arch Biochem Biophys*, 457(2), 252-263. doi:10.1016/j.abb.2006.10.018

Castellani, S., & Conese, M. (2010). Lentiviral vectors and cystic fibrosis gene therapy. *Viruses*, 2(2), 395-412. doi:10.3390/v2020395

Chang, D. T., Honick, A. S., & Reynolds, I. J. (2006). Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons. *J Neurosci*, 26(26), 7035-7045. doi:10.1523/JNEUROSCI.1012-06.2006

Chanson, M. (2009). mucoviscidose, déséquilibre en acides gras, céramides et radeaux membranaires. *Archives de pédiatrie*, 16, 543-545.

Chassaing, B. (2011). *Caractérisation de facteurs bactériens essentiels à la virulence des souches de Escherichia coli associées à la maladie de Crohn*. Université d'Auvergne-Clermont-Ferrand I.

Chautan, M., Charbonnier, M., LEONARDI, J., André, M., Lafont, H., & Nalbone, G. (1991). Modulation of Lipid Chylomicron-Synthesizing Enzymes in Rats by the Dietary (n-6):(n-3) Fatty Acid Ratio. *The journal of nutrition*(0022-3166/91), 6.

Chen, H., & Chan, D. C. (2010). Physiological functions of mitochondrial fusion. *Ann N Y Acad Sci*, 1201, 21-25. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05615.x

Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 48(6), 749-762. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022

Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2011). Redox biology of the intestine. *Free Radic Res*, 45(11-12), 1245-1266. doi:10.3109/10715762.2011.611509

Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2012). Intestinal redox biology and oxidative stress. *Semin Cell Dev Biol*, 23(7), 729-737. doi:10.1016/j.semcdb.2012.03.014

Ciske, D. J., Haavisto, A., Laxova, A., Rock, L. Z., & Farrell, P. M. (2001). Genetic counseling and neonatal screening for cystic fibrosis: an assessment of the communication process. *Pediatrics*, 107(4), 699-705.

Cohen, J. C., & Larson, J. E. (2005). Pathophysiologic consequences following inhibition of a CFTR-dependent developmental cascade in the lung. *BMC Dev Biol*, 5, 2. doi:10.1186/1471-213X-5-2

Cohen, J. C., Morrow, S. L., John Cork, R. J., Delcarpio, J. B., & Larson, J. E. (1998). Molecular Pathophysiology of Cystic Fibrosis Based on the Rescued Knockout Mouse Model. *Molecular Genetics and Metabolism*, 64, 11.

Coleman, R. A., Wang, P., & Ganesh Bhat, B. (1998). Diradylglycerols Alter Fatty Acid Inhibition of Monoacylglycerol Acyltransferase Activity in Triton X-100 Mixed Micelles. *Biochemistry*, 37, 7.

Cottier, V., & Guerry, F. (2000). Thérapie génique. *Clonage et genie genetique*.

Coulon, V. (2001). *Régulation intragénique de la transcription de c-fos: blocage de l'élongation et promoteur alterne*. Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc.

Courtois, F., Seidman, G. E., Delvin, E., Asselin, C., Bernotti, S., Ledoux, M., & Levy, E. (2003). Membrane peroxidation by lipopolysaccharide and iron-ascorbate adversely affects Caco-2 cell function: beneficial role of butyric acid. *American Journal of Clinical Nutrition*, *77*, 7.

Dahm, L. J., & Jones, D. P. (1994). Secretion of cysteine and glutathione from mucosa to lumen in rat small intestine. *American Journal of Physiology*, *267*(2 Pt 1), G292-300.

Dahm, L. J., & Jones, D. P. (2000). Rat jejunum controls luminal thiol-disulfide redox. *Journal of Nutrition*, *130*(11), 2739-2745.

Dalzell, A. M., Freestone, N. S., Billington, D., & Heaf, D. P. (1990). Small intestinal permeability and oro-caecal transit time in cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood*, *65*, 5.

Davies, J. C., Wainwright, C. E., Canny, G. J., Chilvers, M. A., Howenstine, M. S., Munck, A., . . . Yen, K. (2013). Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *187*(11), 1219-1225.

Day, B. J., van Heeckeren, A. M., Min, E., & Velsor, L. W. (2004). Role for Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein in a Glutathione Response to Bronchopulmonary Pseudomonas Infection. *Infection and Immunity*, *72*(4), 2045-2051. doi:10.1128/iai.72.4.2045-2051.2004

De Boeck, K., Derichs, N., Fajac, I., de Jonge, H., Bronsveld, I., Sermet, I., . . . Hug, M. (2011). New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. *Journal of Cystic Fibrosis*, *10*, S53-S66.

De Lisle, R. C. (2014). Disrupted tight junctions in the small intestine of cystic fibrosis mice. *Cell Tissue Res*, *355*(1), 131-142. doi:10.1007/s00441-013-1734-3

De Lisle, R. C. (2016). Decreased Expression of Enterocyte Nutrient Assimilation Genes and Proteins in the Small Intestine of Cystic Fibrosis Mouse. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, *62*(4), 627-634. doi:10.1097/MPG.0000000000001030

De Lisle, R. C., Meldi, L., Flynn, M., & Kyle, J. (2008). Altered Eicosanoid Metabolism in the Cystic Fibrosis Mouse Small Intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, *47*, 11.

De Lisle, R. C., Mueller, R., & Boyd, M. (2011). Impaired mucosal barrier function in the small intestine of the cystic fibrosis mouse. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, *53*(4), 371-379. doi:10.1097/MPG.0b013e318219c397

Derichs, N., Sanz, J., Von Kanel, T., Stolpe, C., Zapf, A., Tümmler, B., . . . Ballmann, M. (2010). Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax*, 65(7), 594-599.

Detmer, S. A., & Chan, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(11), 870-879. doi:10.1038/nrm2275

Devun, F. (2008). *Régulation du Pore de Transition de Perméabilité mitochondrial et toxicité induite par les analogues de l'ubiquinone dans les hépatocytes cancéreux*. Université Joseph-Fourier-Grenoble I.

di Sant'Agnese, P. A., Darling, R. C., Perera, G. A., & Shea, E. (1953). Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics*, 12(5), 549-563.

di Sant'Agnese, P. A., & Talamo, R. C. (1967). Pathogenesis and physiopathology of cystic fibrosis of the pancreas: fibrocystic disease of the pancreas (mucoviscidosis). *New England Journal of Medicine*, 277(24), 1287-1294.

Dixon, B. M., Heath, S. H., Kim, R., Suh, J. H., & Hagen, T. M. (2008). Assessment of endoplasmic reticulum glutathione redox status is confounded by extensive ex vivo oxidation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(5), 963-972. doi:<http://dx.doi.org/10.1089/ars.2007.1869>

Donovan, D. S., Jr., Papadopoulos, A., Staron, R. B., Adesso, V., Schulman, L., McGregor, C., . . . Shane, E. (1998). Bone mass and vitamin D deficiency in adults with advanced cystic fibrosis lung disease. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*, 157(6 Pt 1), 1892-1899. doi:10.1164/ajrccm.157.6.9712089

Dorsey, J., Buckley, D., Summer, S., Jandacek, R. J., Rider, T., Tso, P., . . . Heubi, J. E. (2010). Fat malabsorption in cystic fibrosis: comparison of quantitative fat assay and a novel assay using fecal lauric/behenic acid. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 50(4), 441-446. doi:10.1097/MPG.0b013e3181b18308

Douki, T., Odin, F., Caillat, S., Favier, A., & Cadet, J. (2004). Predominance of the 1,N2-propano 2'-deoxyguanosine adduct among 4-hydroxy-2-nonenal-induced DNA lesions. *Free Radic Biol Med*, 37(1), 62-70. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.013

Drose, S., & Brandt, U. (2012). Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol*, 748, 145-169. doi:10.1007/978-1-4614-3573-0_6

Durieu, I., Abbas-Chorfa, F., Draï, J., Iwaz, J., Steghens, J. P., Puget, M., . . . Bellon, G. (2007). Plasma fatty acids and lipid hydroperoxides increase after antibiotic therapy in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*, 29(5), 958-964. doi:10.1183/09031936.00000906

Durieu, I., & Josserand, R. N. (2008). Cystic fibrosis in 2008. *Rev Med Interne*, 29(11), 901-907. doi:10.1016/j.revmed.2007.12.020

Elgass, K., Pakay, J., Ryan, M. T., & Palmer, C. S. (2013). Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta*, 1833(1), 150-161. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.002

Ernster, L., & Dallner, G. (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta*, 1271(1), 195-204.

Escobar-Henriques, M., & Anton, F. (2013). Mechanistic perspective of mitochondrial fusion: tubulation vs. fragmentation. *Biochim Biophys Acta*, 1833(1), 162-175. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.07.016

Farrell, P. M., Kosorok, M. R., Rock, M. J., Laxova, A., Zeng, L., Lai, H. C., . . . Splaingard, M. L. (2001). Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. *Pediatrics*, 107(1), 1-13.

Farrell, P. M., Rosenstein, B. J., White, T. B., Accurso, F. J., Castellani, C., Cutting, G. R., . . . Parad, R. B. (2008). Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *The journal of pediatrics*, 153(2), S4-S14.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108-115.

Feranchak, A. P., Sontag, M. K., Wagener, J. S., Hammond, K. B., Accurso, F. J., & Sokol, R. J. (1999). Prospective, long-term study of fat-soluble vitamin status in children with cystic fibrosis identified by newborn screen. *Journal of Pediatrics*, 135(5), 601-610.

Finck, B. N., & Kelly, D. P. (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest*, 116(3), 615-622. doi:10.1172/JCI27794

Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.

Friedman, R. J., Lackner, L. L., West, M., Jared R. DiBenedetto, J. R., Nunnari, J., & Voeltz, G. K. (2011). ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science*, 334, 6.

Gadsby, D. C., Vergani, P., & Csanady, L. (2006). The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*, 440(7083), 477-483. doi:10.1038/nature04712

Gagné, C., & Gaudet, D. (2007). *Les Dyslipoprotéïnémies: L'approche clinique* (3ème édition ed.).

Galli, F., Battistoni, A., Gambari, R., Pompella, A., Bragonzi, A., Pilolli, F., . . . Working Group on Inflammation in Cystic, F. (2012). Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta*, 1822(5), 690-713. doi:10.1016/j.bbadis.2011.12.012

Garait, B. (2006). *Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®*. (Doctorat), Joseph Fournier, Grenoble, France.

Garcia, A., Shankar, H., Murugappan, S., Kim, S., & Kunapuli, S. P. (2007). Regulation and functional consequences of ADP receptor mediated ERK2 activation in platelets. *Biochemical journal*, 404, 10.

Garcia, M. A., Yang, N., & Quinton, P. M. (2009). Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion. *J Clin Invest*, 119(9), 2613-2622. doi:10.1172/JCI38662

Garcia-Quintans, N., Prieto, I., Sanchez-Ramos, C., Luque, A., Arza, E., Olmos, Y., & Monsalve, M. (2016). Regulation of endothelial dynamics by PGC-1alpha relies on ROS control of VEGF-A signaling. *Free Radic Biol Med*, 93, 41-51. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.021

Garrel, C., Ceballos-Picot, I., Germain, G., & Al-Gubory, K. H. (2007). Oxidative stress-inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F2alpha-induced luteal cell death in vivo. *Free Radic Res*, 41(3), 251-259. doi:10.1080/10715760601067493

Ghelli, A., Tropeano, C. V., Calvaruso, M. A., Marchesini, A., Iommarini, L., Porcelli, A. M., . . . Rugolo, M. (2013). The cytochrome b p.278Y>C mutation causative of a multisystem disorder enhances superoxide production and alters supramolecular interactions of respiratory chain complexes. *Hum Mol Genet*, 22(11), 2141-2151. doi:10.1093/hmg/ddt067

Gibson, L. E., & Cooke, R. E. (1959). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*, 23(3), 545-549.

Gibson, R. L., Burns, J. L., & Ramsey, B. W. (2003). Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 168(8), 918-951.

Gilkerson, R. W., Selker, J. M. L., & Capaldi, R. A. (2003). The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Letters*, 546(2-3), 355-358. doi:10.1016/s0014-5793(03)00633-1

Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), 6680-6684. doi:10.1038/sj.onc.1209954

Go, Y. M., & Jones, D. P. (2005). Intracellular proatherogenic events and cell adhesion modulated by extracellular thiol/disulfide redox state. *Circulation*, 111(22), 2973-2980.

Godin, R. (2014). A mitochondrial perspective on striated muscle physiopathology: insights from sepsis, denervation, and dystrophinopathies.

Godoy, J. R., Funke, M., Ackermann, W., Haunhorst, P., Oesteritz, S., Capani, F., . . . Lillig, C. H. (2011). Redox atlas of the mouse. Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse. *Biochim Biophys Acta*, 1810(1), 2-92. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.05.006>

Goldsby, R., Kindt, T., Osborne, B., & Kuby, J. (2003). Leukocyte migration and inflammation. *Immunology*, 5th ed. WH Freeman & Co., New York, NY, 338-360.

Gonska, T. (2016). The Gut Is a Key Player in Cystic Fibrosis Malnutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 62(4), 518-519.

Gougeon, M.-L. (2001). Apoptose et virus: les voies de signalisation de la mort cellulaire et les stratégies virales mises en jeu pour moduler ces voies. *Virologie*, 5(5), 347-360.

Guggino, W. B. (2004). The cystic fibrosis transmembrane regulator forms macromolecular complexes with PDZ domain scaffold proteins. *Proc Am Thorac Soc*, 1(1), 28-32. doi:10.1513/pats.2306011

Gustafsson, J. K., Ermund, A., Ambort, D., Johansson, M. E., Nilsson, H. E., Thorell, K., . . . Hansson, G. C. (2012). Bicarbonate and functional CFTR channel are required for proper mucin secretion and link cystic fibrosis with its mucus phenotype. *J Exp Med*, 209(7), 1263-1272. doi:10.1084/jem.20120562

Haardt, M., Benharouga, M., Lechardeur, D., Kartner, N., & Lukacs, G. L. (1999). C-terminal Truncations Destabilize the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator without Impairing Its Biogenesis: A novel class of mutation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21873-21877. doi:10.1074/jbc.274.31.21873

Hakim, F., Kerem, E., Rivlin, J., Bentur, L., Stankiewicz, H., Bdolach-Abram, T., & Wilschanski, M. (2007). Vitamins A and E and Pulmonary Exacerbations in Patients with Cystic Fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 45, 7.

- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, 6210, 628.
- Hamosh, A., FitzSimmons, S. C., Macek, M., Knowles, M. R., Rosenstein, B. J., & Cutting, G. R. (1998). Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *The journal of pediatrics*, 132(2), 255-259.
- Han, D., Canali, R., Rettori, D., & Kaplowitz, N. (2003). Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Molecular Pharmacology*, 64(5), 1136-1144.
- Han, Y., & Chen, J. Z. (2013). Oxidative stress induces mitochondrial DNA damage and cytotoxicity through independent mechanisms in human cancer cells. *Biomed Res Int*, 2013, 825065. doi:10.1155/2013/825065
- Hansen, J. M., Go, Y. M., & Jones, D. P. (2006). Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*, 46, 215-234.
- Hansson, M. J., Månsson, R., Morota, S., Uchino, H., Kallur, T., Sumi, T., . . . Jegorov, A. (2008). Calcium-induced generation of reactive oxygen species in brain mitochondria is mediated by permeability transition. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(3), 284-294.
- Haunhorst, P., Berndt, C., Eitner, S., Godoy, J. R., & Lillig, C. H. (2010). Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 394(2), 372-376. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.016
- Hayden, M. S., West, A. P., & Ghosh, S. (2006). NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*, 25(51), 6758-6780. doi:10.1038/sj.onc.1209943
- Head, B., Griparic, L., Amiri, M., Gandre-Babbe, S., & van der Bliet, A. M. (2009). Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J Cell Biol*, 187(7), 959-966. doi:10.1083/jcb.200906083
- Heeckeren, A., Walenga, R., Konstan, M. W., Bonfield, T., Davis, P. B., & Ferkol, T. (1997). Excessive inflammatory response of cystic fibrosis mice to bronchopulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Investigation*, 100(11), 2810-2815.
- Hellal, M. (2007). *Phtalazinones et 2, 3-benzodiazépinones dérivées de l'azélastine: Synthèses et activités anti-cytokine*. Université Louis Pasteur (Strasbourg).

Hirst, J. (2011). Why does mitochondrial complex I have so many subunits? *Biochem J*, 437(2), e1-3. doi:10.1042/BJ20110918

Hoppins, S. (2014). The regulation of mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, 29, 46-52. doi:10.1016/j.ceb.2014.03.005

Huang, C. Y., Wu, Y. M., Hsu, C. Y., Lee, W. S., Lai, M. D., Lu, T. J., . . . Yuan, C. J. (2002). Caspase activation of mammalian sterile 20-like kinase 3 (Mst3). Nuclear translocation and induction of apoptosis. *J Biol Chem*, 277(37), 34367-34374. doi:10.1074/jbc.M202468200

Huang, S. H., Schall, J. I., Zemel, B. S., & Stallings, V. A. (2006). Vitamin E status in children with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency. *Journal of Pediatrics*, 148(4), 556-559.

Hudson, V. M. (2004). New insights into the pathogenesis of cystic fibrosis: pivotal role of glutathione system dysfunction and implications for therapy. *Treatments in Respiratory Medicine*, 3(6), 353-363.

Hyde, B. B., Twig, G., & Shirihai, O. S. (2010). Organellar vs cellular control of mitochondrial dynamics. *Semin Cell Dev Biol*, 21(6), 575-581. doi:10.1016/j.semcdb.2010.01.003

Igreja, S., Clarke, L. A., Botelho, H. M., Marques, L., & Amaral, M. D. (2016). Correction of a cystic fibrosis splicing mutation by antisense oligonucleotides. *Human Mutation*, 37(2), 209-215.

Iuliano, L., Monticolo, R., Straface, G., Zullo, S., Galli, F., Boaz, M., & Quattrucci, S. (2009). Association of cholesterol oxidation and abnormalities in fatty acid metabolism in cystic fibrosis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90(3), 477-484. doi:<http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.2009.27757>

Iyer, S. S., & Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews™ in Immunology*, 32(1).

Jones, D. P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9-10), 1865-1879.

Jones, D. P., & Go, Y. M. (2010). Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 12 Suppl 2, 116-125. doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01266.x>

Joseph, J., Shukitt-Hale, B., Casadesus, G., & Fisher, D. (2005). Oxidative stress and inflammation in brain aging: nutritional considerations. *Neurochemical research*, 30(6-7), 927-935.

Kalivianakis, M., Minich, D. M., Bijleveld, C. M. A., van Aalderen, W. M. C., Stellaard, F., Laseur, M., . . . Verkade, H. J. (1999). Fat malabsorption in cystic fibrosis patients receiving enzyme replacement therapy is due to impaired intestinal uptake of long-chain fatty acids. *American Journal of Clinical Nutrition*, *69*, 8.

Karbowski, M., Norris, K. L., Cleland, M. M., Jeong, S. Y., & Youle, R. J. (2006). Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature*, *443*(7112), 658-662. doi:10.1038/nature05111

Kashatus, D. F., Lim, K. H., Brady, D. C., Pershing, N. L., Cox, A. D., & Counter, C. M. (2011). RALA and RALBP1 regulate mitochondrial fission at mitosis. *Nat Cell Biol*, *13*(9), 1108-1115. doi:10.1038/ncb2310

Kehrer, J. P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, *149*, 8.

Kelly-Aubert, M., Trudel, S., Fritsch, J., Nguyen-Khoa, T., Baudouin-Legros, M., Moriceau, S., . . . Edelman, A. (2011). GSH monoethyl ester rescues mitochondrial defects in cystic fibrosis models. *Hum Mol Genet*, *20*(14), 2745-2759. doi:10.1093/hmg/ddr173

Kemp, M., Go, Y. M., & Jones, D. P. (2008). Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med*, *44*(6), 921-937.

Klymiuk, N., Mundhenk, L., Kraehe, K., Wuensch, A., Plog, S., Emrich, D., . . . Wolf, E. (2012). Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. *Journal of Molecular Medicine*, *90*(5), 597-608.

Knorre, A., Wagner, M., Hans-Eckart Schaefer, H. E., Colledge, W. H., & Pahl, H. L. (2002). Delta F508-CFTR Causes Constitutive NF- κ B Activation through an ER-Overload Response in Cystic Fibrosis Lungs. *Biol. Chem.*, *383*, 12.

Koehler, D. R., Sajjan, U., Chow, Y. H., Martin, B., Kent, G., Tanswell, A. K., . . . Hu, J. (2003). Protection of Cfr knockout mice from acute lung infection by a helper-dependent adenoviral vector expressing Cfr in airway epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(26), 15364-15369.

Kopito, R. R. (1999). Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev*, *79*(1 Suppl), S167-173.

Korotkova, M., & Strandvik, B. (2000). Essential fatty acid deficiency affects the fatty acid composition of the rat small intestinal and colonic mucosa differently. *Biochim Biophys Acta*, *1487*, 7.

- Kristidis, P., Bozon, D., Corey, M., Markiewicz, D., Rommens, J., Tsui, L. C., & Durie, P. (1992). Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet*, *50*(6), 1178-1184.
- Kukidome, D., Nishikawa, T., Sonoda, K., Imoto, K., Fujisawa, K., Yano, M., . . . Araki, E. (2006). Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes*, *55*(1), 120-127.
- Kushnareva, Y., Murphy, A. N., & Andreyev, A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P) oxidation-reduction state. *Biochemistry journal*, *368*, 9.
- Kussmaul, L., & Hirst, J. (2006). The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(20), 7607-7612. doi:10.1073/pnas.0510977103
- Lack, E. E., Perez-Atayde, A. R., & Young, J. B. (1985). Carotid body hyperplasia in cystic fibrosis and cyanotic heart disease. A combined morphometric, ultrastructural, and biochemical study. *Am J Pathol*, *119*(2), 301-314.
- Lackner, L. L. (2013). Determining the shape and cellular distribution of mitochondria: the integration of multiple activities. *Curr Opin Cell Biol*, *25*(4), 471-476. doi:10.1016/j.ceb.2013.02.011
- Lackner, L. L. (2014). Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC biology*, *12*(1), 35.
- Lackner, L. L., & Nunnari, J. M. (2009). The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *Biochim Biophys Acta*, *1792*(12), 1138-1144. doi:10.1016/j.bbadis.2008.11.011
- Lai, E., Teodoro, T., & Volchuk, A. (2007). Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)*, *22*, 193-201. doi:10.1152/physiol.00050.2006
- Lands, L. C., Grey, V. L., & Grenier, C. (2000). Total Plasma Antioxidant Capacity in Cystic Fibrosis. *Pediatric Pulmonology* *29*:81–87, *29*, 7.
- Larrey, D. (2001). Pathologies hépatiques mitochondriales pdf. *Gastroentérologie clinique et biologique*, *25*, B117-B122.

- Laskowska-Klita, T., & Chelchowska, M. (2001). Antioxidant status in erythrocytes of cystic fibrosis children. *Acta Biochim Pol*, 48(1), 283-285.
- Lebowitz, J., Edinger, R. S., An, B., Perry, C. J., Onate, S., Kleyman, T. R., & Johnson, J. P. (2004). Ikappab kinase-beta (ikkbeta) modulation of epithelial sodium channel activity. *J Biol Chem*, 279(40), 41985-41990. doi:10.1074/jbc.M403923200
- Lee, I. T., & Yang, C. M. (2012). Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochem Pharmacol*, 84(5), 581-590. doi:10.1016/j.bcp.2012.05.005
- Lee, S. H., Arora, J. A., Oe, T., & Blair, I. A. (2005). 4-Hydroperoxy-2-nonenal-Induced formation of,N2-Etheno-2'-deoxyguanosine Adducts1. *Chemical Research in Toxicology*, 18, 7.
- Lee, Y.-J., Jeong, S.-Y., Karbowski, M., Smith, C. L., & Youle, R. J. (2004). Roles of the Mammalian Mitochondrial Fission and Fusion Mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in Apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 11. doi:10.1091/mbc.E04
- Lefèvre, F. (1989). Le système interféron: structure, biologie, applications. *Ann Rech Vét*, 20, 17-38.
- Legros, F., Anne Lombès, A., Frachon, P., & Rojo, M. (2002). Mitochondrial Fusion in Human Cells Is Efficient, Requires the Inner Membrane Potential, and Is Mediated by Mitofusins. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 12. doi:10.1091/mbc.E02-
- Lenoir, G., Sermet, I., & Duhamel, J.-F. (2001). La mucoviscidose en 2001: le dépistage et la pharmacologie du CFTR. *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 7, 437-443.
- Leon, M. L., & Zuckerman, S. H. (2005). Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. *Inflamm Res*, 54(10), 395-411. doi:10.1007/s00011-005-1377-2
- Lepage, G., Paradis, K., Lacaille, F., Sénéchal, L., Ronco, N., Champagne, J., . . . Rasquin-Weber, A. (1996). Ursodeoxycholic acid improves thehepatic metabolism of essential fattyacids and retinol in children with cystic fibrosis. *The journal of pediatrics*, 130(1), 7.
- Leschelle, X., Gubern, M., Andriamihaja, M., Blottiere, H. M., Couplan, E., Gonzalez-Barroso, M. D., . . . Blachier, F. (2005). Adaptative metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. *Biochim Biophys Acta*, 1725(2), 201-212.

Levine, R. L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease 2, 3. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(9), 790-796.

Levy, E. (2015). Insights from human congenital disorders of intestinal lipid metabolism. *Journal of Lipid Research*, 56(5), 945-962.

Levy, E., Garofalo, C., Thibault, L., Dionne, S., Daoust, L., Lepage, G., & Roy, C. C. (1992). Intraluminal and intracellular phases of fat absorption are impaired in essential fatty acid deficiency. *The American physiological society*(0193-1857/ 92), 8.

Levy, E., Lepage, G., Bendayan, M., Ronco, N., Thibault, L., Galiano, N., . . . Roy, C. C. (1989). Relationship of decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities to essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients. *Journal of Lipid Research*, 30, 13.

Li, C., & Naren, A. P. (2010). CFTR chloride channel in the apical compartments: spatiotemporal coupling to its interacting partners. *Integr Biol (Camb)*, 2(4), 161-177. doi:10.1039/b924455g

Li, H., Ganta, S., & Fong, P. (2010). Altered ion transport by thyroid epithelia from CFTR(-/-) pigs suggests mechanisms for hypothyroidism in cystic fibrosis. *Exp Physiol*, 95(12), 1132-1144. doi:10.1113/expphysiol.2010.054700

Liesa, M., & Shirihai, O. S. (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab*, 17(4), 491-506. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.002

Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C. Y., Wu, Z., Boss, O., . . . Spiegelman, B. M. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, 418(6899), 797-801. doi:10.1038/nature00904

Liou, T. G., Adler, F. R., Fitzsimmons, S. C., Cahill, B. C., Hibbs, J. R., & Marshall, B. C. (2001). Predictive 5-year survivorship model of cystic fibrosis. *Am J Epidemiol*, 153(4), 345-352.

Lisowska, A., Wójtowicz, J., & Walkowiak, J. (2009). Small intestine bacterial overgrowth is frequent in cystic fibrosis: combined hydrogen and methane measurements are required for its detection. *Acta Biochimica Polonica*, 56 (4), 4.

Liu, Y., Fiskum, G., & Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*, 80(5), 780-787.

Lobry, C., & Weil, R. (2007). Mécanismes régulateurs de la voie NF- κ B dans les lymphocytes T. *médecine/sciences*, 23(10), 857-861.

Long, R. (2014). *Implication des fonctions mitochondriales dans l'effet cardioprotecteur induit par la sur-expression de la protéine H11 kinase/Hsp22 chez la souris*. Université Paris Sud-Paris XI.

Lonlay, P. d., Djouadi, F., Bonnefont, J. P., Saudubray, J. M., & Bastin, J. (2002). La Bêta-oxydation mitochondriale des acides gras : une voie métabolique essentielle du fonctionnement musculaire. *Archives pédiatriques*, 9, 4.

Loro, L., Vintermyr, O., & Johannessen, A. (2005). Apoptosis in normal and diseased oral tissues. *Oral diseases*, 11(5), 274-287.

Lowe, C. U., May, C. D., & Reed, S. C. (1949). Fibrosis of the pancreas in infants and children; a statistical study of clinical and hereditary features. *Am J Dis Child*, 78(3), 349-374.

Machen, T. E. (2006). Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory? *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 291(2), C218-C230.

Mackenzie, J., Pedersen, L., Arent, S., & Henriksen, A. (2006). Controlling electron transfer in Acyl-CoA oxidases and dehydrogenases: a structural view. *J Biol Chem*, 281(41), 31012-31020. doi:10.1074/jbc.M603405200

Madan, J. C., Koestler, D. C., Stanton, B. A., Davidson, L., Moulton, L. A., Housman, M. L., . . . O'Toole, G. A. (2012). Serial analysis of the gut and respiratory microbiome in cystic fibrosis in infancy: interaction between intestinal and respiratory tracts and impact of nutritional exposures. *MBio*, 3(4). doi:10.1128/mBio.00251-12

Mailhot, G., Ravid, Z., Barchi, S., Moreau, A., Rabasa-Lhoret, R., & Levy, E. (2009). CFTR knockdown stimulates lipid synthesis and transport in intestinal Caco-2/15 cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology*, 297(6), G1239-1249. doi:10.1152/ajpgi.00206.2009

Malhotra, J. D., & Kaufman, R. J. (2007). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(12), 2277-2293. doi:10.1089/ars.2007.1782

Mall, M., Grubb, B. R., Harkema, J. R., O'Neal, W. K., & Boucher, R. C. (2004). Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med*, 10(5), 487-493. doi:10.1038/nm1028

Manfredi, A. A., Rovere-Querini, P., Brunelli, S., & Clementi, E. (2008). Cell death: tipping the balance of autoimmunity and tissue repair. *Current pharmaceutical design*, 14(3), 269-277.

- Mannella, C. A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta*, 1763(5-6), 542-548. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.04.006
- Marcil, V., Peretti, N., Delvin, E., & Levy, E. (2004). Les processus digestifs des lipides alimentaires. *gastroenterology and clinical biology*, 28, 11.
- Mardinoglu, A., Shoaie, S., Bergentall, M., Ghaffari, P., Zhang, C., Larsson, E., . . . Nielsen, J. (2015). The gut microbiota modulates host amino acid and glutathione metabolism in mice. *Mol Syst Biol*, 11(10), 834. doi:10.15252/msb.20156487
- Marshall, B. C., Butler, S. M., Stoddard, M., Moran, A. M., Liou, T. G., & Morgan, W. J. (2005). Epidemiology of cystic fibrosis-related diabetes. *Journal of Pediatrics*, 146(5), 681-687. doi:10.1016/j.jpeds.2004.12.039
- Martel, A. (2010). Étude de la régulation du facteur de transcription NF-kB dans l'infection par le RSV.
- Martin, C. R., Zaman, M. M., Ketwaroo, G. A., Bhutta, A. Q., Coronel, E., Popov, Y., . . . Freedman, S. D. (2012). CFTR dysfunction predisposes to fibrotic liver disease in a murine model. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology*, 303(4), G474-481. doi:10.1152/ajpgi.00055.2012
- Martin, S., Takayama, S., McGahon, A., Miyashita, T., Corbeil, J., Kolesnick, R., . . . Green, D. (1995). Inhibition of ceramide-induced apoptosis by Bcl-2. *Cell death and differentiation*, 2(4), 253-257.
- Martin, S. J., & Green, D. R. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*, 82(3), 349-352.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 16(10), 577-586. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.05.013
- Matsui, H., Grubb, B. R., Tarran, R., Randell, S. H., Gatzky, J. T., Davis, C. W., & Boucher, R. C. (1998). Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell*, 95(7), 1005-1015.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem*, 244(22), 6049-6055.

Meyerholz, D. K., Stoltz, D. A., Pezzulo, A. A., & Welsh, M. J. (2010). Pathology of gastrointestinal organs in a porcine model of cystic fibrosis. *Am J Pathol*, *176*(3), 1377-1389. doi:10.2353/ajpath.2010.090849

Miller, K. E., & Sheetz, M. P. (2004). Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J Cell Sci*, *117*(Pt 13), 2791-2804. doi:10.1242/jcs.01130

Miloudi, K., Comte, B., Rouleau, T., Montoudis, A., Levy, E., & Lavoie, J. C. (2012). The mode of administration of total parenteral nutrition and nature of lipid content influence the generation of peroxides and aldehydes. *Clin Nutr*, *31*(4), 526-534. doi:10.1016/j.clnu.2011.12.012

Mimoun, M., Coste, T. C., Lebacqz, J., Lebecque, P., Wallemacq, P., Leal, T., & Armand, M. (2009). Increased tissue arachidonic acid and reduced linoleic acid in a mouse model of cystic fibrosis are reversed by supplemental glycerophospholipids enriched in docosahexaenoic acid. *Journal of Nutrition*, *139*(12), 2358-2364. doi:<http://dx.doi.org/10.3945/jn.109.110999>

Minich, D. M., Vonk, R. J., & Verkade, H. J. (1997). Intestinal absorption of essential fatty acids under physiological and essential fatty acid-deficient conditions. *Journal of Lipid Research*, *38*, 13.

Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G., & Lippincott-Schwartz, J. (2009). A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(29), 11960-11965. doi:10.1073/pnas.0904875106

Miz-Echevarriá, L. A., Prieto, J. A., Andrade, F., Elorz, J., Sojo, A., Lage, S., . . . Rodri'Guez-Soriano, J. (2009). Persistence of Essential Fatty Acid Deficiency in Cystic Fibrosis despite Nutritional Therapy. *Pediatric Research*, *66*, 5.

Moore-Gagné, J. (2012). HDAC1 et la régulation des processus inflammatoires dans les cellules épithéliales intestinales.

Morel, Y., & Barouki, R. (1998). Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *médecine/sciences*, *14*, 9.

Moriarty-Craige, S. E., & Jones, D. P. (2004). Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annual Review of Nutrition*, *24*, 481-509.

Morin, C. (2010). *Rôles physiologiques et modes d'action des eicosanoïdes produits par les cytochromes P450 dans le poumon*: Université de Sherbrooke.

Morris, R. L., & Hollenbeck, P. J. (1993). The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. *J Cell Sci*, *104*, 11.

Mouli, P. K., Twig, G., & Shirihai, O. S. (2009). Frequency and selectivity of mitochondrial fusion are key to its quality maintenance function. *Biophys J*, 96(9), 3509-3518. doi:10.1016/j.bpj.2008.12.3959

Mouterde, O. (2007). Manifestations digestives et nutritionnelles de la mucoviscidose. *Revue francophone des laboratoires*, 397, 43-47.

Mukhopadhyay, S., Hoidal, J. R., & Mukherjee, T. K. (2006). Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res*, 7, 125. doi:10.1186/1465-9921-7-125

Munck, A. (2005). Atteinte digestive de la mucoviscidose chez l'enfant *Médecine Thérapeutique Pédiatrie*, 8, 197-203.

Munck, A. (2014). Cystic fibrosis: evidence for gut inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*, 52, 180-183. doi:10.1016/j.biocel.2014.02.005

Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417(1), 1-13. doi:10.1042/BJ20081386

Naruse, S. (2002). cystic fibrosis and related diseases of the pancreas *Best practice and Research. Clinical gastroenterology*, 16 numéro 3, 511-526.

Nassour, J. (2015). *Rôle du stress oxydant et des cassures de l'ADN dans l'émergence néoplasique post-sénescence*. Université du Droit et de la Santé-Lille II.

Ndiaye, D. (2014). *Rôle des mitochondries dans la régulation des oscillations de calcium des hépatocytes: approches expérimentale et computationnelle*. Citeseer.

Njoroge, S. W., Laposata, M., Katrangi, W., & Seegmiller, A. C. (2012). DHA and EPA reverse cystic fibrosis-related FA abnormalities by suppressing FA desaturase expression and activity. *J Lipid Res*, 53(2), 257-265. doi:10.1194/jlr.M018101

Norkina, O., Burnett, T. G., & De Lisle, R. C. (2004). Bacterial overgrowth in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator null mouse small intestine. *Infect Immun*, 72(10), 6040-6049. doi:10.1128/IAI.72.10.6040-6049.2004

Norkina, O., Kaur, S., Ziemer, D., & De Lisle, R. C. (2004). Inflammation of the cystic fibrosis mouse small intestine. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology*, 286(6), G1032-1041. doi:10.1152/ajpgi.00473.2003

- Ntimbane, T., Comte, B., Mailhot, G., Berthiaume, Y., Poitout, V., Prentki, M., . . . Levy, E. (2009). Cystic fibrosis-related diabetes: from CFTR dysfunction to oxidative stress. *Clin Biochem Rev*, 30(4), 153-177.
- Nunnari, J., Marshall, W. F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J. W., & Walter, P. (1997). Mitochondrial Transmission during Mating in *Saccharomyces cerevisiae* Is Determined by Mitochondrial Fusion and Fission and the Intramitochondrial Segregation of Mitochondrial DNA. *Molecular Biology of the Cell*, 8, 10.
- Nzengue, Y. (2008). *Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53*. (Doctorat), Joseph Fournier, Grenoble, France.
- O'Brien, S., Mulcahy, H., Fenlon, H., O'Broin, A., Casey, M., Burke, A., . . . Hegarty, J. E. (1993). Intestinal bile acid malabsorption in cystic fibrosis. *Gut*, 34, 6.
- O'Sullivan, B. P., & Freedman, S. D. (2009). Cystic Fibrosis. *Lancet* 2009; 373: 1891–904, 373, 14. doi:10.1016/S0140-
- Ogretmen, B., & Hannun, Y. A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer*, 4(8), 604-616. doi:10.1038/nrc1411
- Okado-Matsumoto, A., & Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver Cu, Zn-SOD in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38388-38393.
- Ollero, M., Junaidi, O., Zaman, M. M., Tzamelis, I., Ferrando, A. A., Andersson, C., . . . Freedman, S. D. (2004). Decreased expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma in *cftr*^{-/-} mice. *J Cell Physiol*, 200(2), 235-244. doi:10.1002/jcp.20020
- Ortona, E., Margutti, P., Matarrese, P., Franconi, F., & Malorni, W. (2008). Redox state, cell death and autoimmune diseases: a gender perspective. *Autoimmun Rev*, 7(7), 579-584. doi:10.1016/j.autrev.2008.06.001
- Oudshoorn, J. H., Lecluse, A. L. Y., Berg, R. v. d., Wouter H.J. Vaes, Laag, J. v. d., & Houwen, R. H. J. (2006). Decreased Coenzyme Q10 Concentration in Plasma of Children with Cystic Fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 43, 5.
- Panagopoulou, P., Fotoulaki, M., Nikolaou, A., & Nousia-Arvanitakis, S. (2014). Prevalence of malnutrition and obesity among cystic fibrosis patients. *Pediatr Int*, 56(1), 89-94. doi:10.1111/ped.12214

- Parker, N., Crichton, P. G., Vidal-Puig, A. J., & Brand, M. D. (2009). Uncoupling protein-1 (UCP1) contributes to the basal proton conductance of brown adipose tissue mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 41(4), 335-342. doi:10.1007/s10863-009-9232-8
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*, 333(1), 19-39. doi:10.1016/s0009-8981(03)00200-6
- Pecker, F., Amadou, A., Magne, S., & Pavoine, C. (1998). Le rôle messager de l'acide arachidonique dans le cardiomyocyte.
- Peretti, N., Marcil, V., Drouin, E., & Levy, E. (2005). Mechanisms of lipid malabsorption in Cystic Fibrosis: the impact of essential fatty acids deficiency. *Nutr Metab (Lond)*, 2(1), 18. doi:10.1186/1743-7075-2-11
- Peretti, N., Roy, C. C., Drouin, E., Seidman, E., P., B., Casimir, G., & Levy, E. (2006). Abnormal intracellular lipid processing contributes to fat malabsorption in cystic fibrosis patients. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 290, 7. doi:10.1152/ajpgi.00332.2005.-A
- Perevoshchikova, I. V., Quinlan, C. L., Orr, A. L., Gerencser, A. A., & Brand, M. D. (2013). Sites of superoxide and hydrogen peroxide production during fatty acid oxidation in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 61C, 298-309. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.006
- Perricone, C., De Carolis, C., & Perricone, R. (2009). Glutathione: a key player in autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 8(8), 697-701. doi:10.1016/j.autrev.2009.02.020
- Petit, V., Niot, I., Poirier, H., & Besnard, P. (2007). Absorption intestinale des acides gras: faits et incertitudes. *Nutrition clinique et métabolisme*, 21(1), 38-45.
- Pham, C. T. (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 6(7), 541-550. doi:10.1038/nri1841
- Pilewski, J. M., & Frizzell, R. A. (1999). Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev*, 79(1 Suppl), S215-255.
- Pitkanen, S., & Robinson, B. H. (1996). Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J Clin Invest*, 98(2), 345-351. doi:10.1172/JCI118798

Praefcke, G. J., & McMahon, H. T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(2), 133-147. doi:10.1038/nrm1313

Prakash, C., & Kumar, V. (2016). Arsenic-induced mitochondrial oxidative damage is mediated by decreased PGC-1alpha expression and its downstream targets in rat brain. *Chem Biol Interact*, 256, 228-235. doi:10.1016/j.cbi.2016.07.017

Precourt, L. P., Seidman, E., Delvin, E., Amre, D., Deslandres, C., Dominguez, M., . . . Levy, E. (2009). Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(7), 1628-1637. doi:10.1016/j.biocel.2009.02.013

Proesmans, M., Vermeulen, F., & De Boeck, K. (2008). What's new in cystic fibrosis? From treating symptoms to correction of the basic defect. *Eur J Pediatr*, 167(8), 839-849. doi:10.1007/s00431-008-0693-2

Quinton, P. M. (1983). Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*, 301(5899), 421-422.

Quinton, P. M. (2008). Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *The Lancet*, 372(9636), 415-417. doi:10.1016/s0140-6736(08)61162-9

Rafelski, S. M. (2013). Mitochondrial network morphology: building an integrative, geometrical view. *BMC Biology* 2013, 11:71, 11(71), 9.

Raia, V., Maiuri, L., de Ritis, G., de Vizia, B., Vacca, L., Conte, R., . . . Londei, M. (2000). Evidence of chronic inflammation in morphologically normal small intestine of cystic fibrosis patients. *Pediatr Res*, 47(3), 344-350.

Ramirez, A., Ramadan, B., Ritzenthaler, J. D., Rivera, H. N., Jones, D. P., & Roman, J. (2007). Extracellular cysteine/cystine redox potential controls lung fibroblast proliferation and matrix expression through upregulation of transforming growth factor-beta. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293(4), L972-981. doi:10.1152/ajplung.00010.2007

Ramsay, R. R., Steenkamp, D. J., & Husain, M. (1987). Reactions of electron-transfer flavoprotein and electron-transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase. *Biochemistry journal*, 241, 10.

Ratjen, F., & Döring, G. (2003). Cystic fibrosis. *The Lancet*, 361(9358), 681-689. doi:10.1016/s0140-6736(03)12567-6

Ravilly, S., Roux, E. L., bellis, G., & Dufour, F. (2007). Epidémiologie et physiopathologie de la mucoviscidose. *Revue francophone des laboratoires*, 397, 26-36.

Reinecker, H. C., Steffen, M., Witthoef, T., Pflueger, I., Schreiber, S., MacDermott, R. P., & Raedler, A. (1993). Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 94(1), 174-181.

Reis, F. J., & Damaceno, N. (1998). Cystic fibrosis. *J Pediatr (Rio J)*, 74 Suppl 1, S76-94.

Resta-Lenert, S., & Barrett, K. E. (2002). Enteroinvasive bacteria alter barrier and transport properties of human intestinal epithelium: role of iNOS and COX-2. *Gastroenterology*, 122(4), 1070-1087.

Ricquier, D., & Bouillaud, F. (1998). Protéines découplantes mitochondriales. *médecine/sciences*, 14(8-9), 9.

Robb, T. A., Davidson, G. P., & Kirubakaran, C. (1985). Conjugated bile acids in serum and secretions in response to cholecystokinin secretin stimulation in children with cystic fibrosis. *Gut*, 26, 12.

Rosenstein, B. J., & Cutting, G. R. (1998). The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *The journal of pediatrics*, 132(4), 589-595.

Rottner, M., Freyssinet, J. M., & Martinez, M. C. (2009). Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. *Respir Res*, 10, 23. doi:10.1186/1465-9921-10-23

Rowe, S. M., Miller, S., & Sorscher, E. J. (2005). Cystic Fibrosis. *The new england journal of medicine and Health*, 352, 10.

Russo-Marie, F. (1998). *L'inflammation*: John Libbey Eurotext.

Ruzicka, F. J., & Beinert, H. (1977). A New Iron-Sulfur Flavoprotein of the Respiratory chain a component of the fatty acid β oxidation pathway. *J Biol Chem*, 252(23), 6.

Sabharwal, S. (2016). Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 12(1), 43-47.

Sagel, S. D., Sontag, M. K., Anthony, M. M., Emmett, P., & Papas, K. A. (2011). Effect of an antioxidant-rich multivitamin supplement in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 10(1), 31-36. doi:10.1016/j.jcf.2010.09.005

Sane, A. T., Sinnott, D., Delvin, E., Bendayan, M., Marcil, V., Menard, D., . . . Levy, E. (2006). Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res*, 47(10), 2112-2120. doi:10.1194/jlr.M600174-JLR200

Scarpulla, R. C. (2012). Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress. *Biochim Biophys Acta*, 1819(9-10), 1088-1097. doi:10.1016/j.bbagr.2011.10.011

Scarpulla, R. C., Vega, R. B., & Kelly, D. P. (2012). Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 23(9), 459-466. doi:10.1016/j.tem.2012.06.006

Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*, 30(11), 1191-1212.

Schapira, A., Cooper, J., Dexter, D., Clark, J., Jenner, P., & Marsden, C. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 54(3), 823-827.

Schonfeld, P., & Wojtczak, L. (2008). Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, 45(3), 231-241. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.029

Schroeder, B. O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., . . . Wehkamp, J. (2011). Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. *Nature*, 469(7330), 419-423. doi:10.1038/nature09674

Shalon, L. B., & Adelson, J. W. (1996). Cystic Fibrosis Gastrointestinal Complications and Gene Therapy. *Pediatric Clinics of North America*, 43(1).

Shapiro, B. L., Lam, L. F. H., & Feigal, R. J. (1982). Mitochondrial NADH Dehydrogenase in Cystic Fibrosis: Enzyme Kinetics in Cultured Fibroblasts. *American Journal of Human Genetics*, 34, 7.

Shaulian, E., & Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, 4(5), E131-136. doi:10.1038/ncb0502-e131

Shindo, K., Machida, M., Fukumura, M., Koide, K., & Yamazaki, R. (1998). Omeprazole induces altered bile acid metabolism. *Gut*, 42, 7.

Shutt, T., Geoffrion, M., Milne, R., & McBride, H. M. (2012). The intracellular redox state is a core determinant of mitochondrial fusion. *EMBO Rep*, 13(10), 909-915. doi:10.1038/embor.2012.128

Singh, N. N., & Ramji, D. P. (2006). The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17(6), 487-499. doi:10.1016/j.cytogfr.2006.09.002

Smyth, R. L., Croft, N. M., O'Hea, U., Marshall, T. G., & Ferguson, A. (2000). Intestinal inflammation in cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood*, 82(5), 394-399.

Sokol, R. J., Reardon, M. C., Accurso, F. J., Stall, C., Narkewicz, M., Abman, S. H., & Hammond, K. B. (1989). Fat-soluble-vitamin status during the first year of life in infants with cystic fibrosis identified by screening of newborns. *American Journal of Clinical Nutrition*, 50(5), 1064-1071.

Spear, N., & Aust, S. D. (1995). Effects of glutathione on Fenton reagent-dependent radical production and DNA oxidation. *Arch Biochem Biophys*, 324(1), 111-116. doi:10.1006/abbi.1995.9921

St-Louis, R. (2011). *Implication des espèces réactives de l'oxygène dans le contrôle central de l'osmorégulation*. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

St-Martin Crites, K. (2015). Inflammation intestinale associée à la fibrose kystique: rôle du CFTR et propriétés anti-inflammatoires de la vitamine D.

St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jager, S., . . . Spiegelman, B. M. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, 127(2), 397-408. doi:10.1016/j.cell.2006.09.024

Stavru, F., Bouillaud, F., Sartori, A., Ricquier, D., & Cossart, P. (2011). *Listeria monocytogenes* transiently alters mitochondrial dynamics during infection. *PNAS | March 1, 2011 | vol. 108 | no. 9, 108(9), 6*.

Steenkamp, D. J. (1988). Cross-linking of the electron-transfer flavoprotein to electron-transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase with heterobifunctional reagents. *Biochemistry journal*, 255, 8.

Storni, V., Claustres, M., Chinet, T., & Ravilly, S. (2001). Diagnostic de la mucoviscidose. *Archives pédiatriques*.

Strandvik, B. (2010). Fatty acid metabolism in cystic fibrosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 83(3), 121-129. doi:10.1016/j.plefa.2010.07.002

Sun, X., Sui, H., Fisher, J. T., Yan, Z., Liu, X., Cho, H. J., . . . Engelhardt, J. F. (2010). Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 120(9), 3149-3160.

- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., & Mihara, K. (2007). Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem*, *282*(15), 11521-11529. doi:10.1074/jbc.M607279200
- Taha, R., Seidman, E., Mailhot, G., Boudreau, F., Gendron, F. P., Beaulieu, J. F., . . . Levy, E. (2010). Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 cell line. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, *5*(7), e11817. doi:10.1371/journal.pone.0011817
- Tang, L., Fatehi, M., & Linsdell, P. (2009). Mechanism of direct bicarbonate transport by the CFTR anion channel. *J Cyst Fibros*, *8*(2), 115-121. doi:10.1016/j.jcf.2008.10.004
- Tarran, R., Grubb, B. R., Parsons, D., Picher, M., Hirsh, A. J., Davis, C. W., & Boucher, R. C. (2001). The CF salt controversy: in vivo observations and therapeutic approaches. *Mol Cell*, *8*(1), 149-158.
- Taylor, C. J., & Connolly, S. (2009). Hepatobiliary disease in cystic fibrosis. *Paediatrics and child health*, *20*(1), 6.
- Taylor, C. J., Hillel, P. G., Ghosal, S., Frier, M., Senior, S., Tindale, W. B., & Read, N. (1999). Gastric emptying and intestinal transit of pancreatic enzyme supplements in cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood*, *80*, 5.
- Tirouvanziam, R., Conrad, C. K., Bottiglieri, T., Herzenberg, L. A., Moss, R. B., & Herzenberg, L. A. (2006). High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(12), 4628-4633.
- Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., . . . Martinou, J. C. (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J*, *28*(11), 1589-1600. doi:10.1038/emboj.2009.89
- Treberg, J. R., Quinlan, C. L., & Brand, M. D. (2011). Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem*, *286*(31), 27103-27110. doi:10.1074/jbc.M111.252502
- Trotter, P. J., Ho, S. Y., & Storch, J. (1996). Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *Journal of Lipid Research*, *37*, 11.
- Twig, G., Hyde, B., & Shirihai, O. S. (2008). Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta*, *1777*(9), 1092-1097. doi:10.1016/j.bbabi.2008.05.001

- Uehara, Y., Engel, T., Li, Z., Goepfert, C., Rust, S., Zhou, X., . . . Von Eckardstein, A. (2002). Polyunsaturated Fatty Acids and Acetoacetate Downregulate the Expression of the ATP-Binding Cassette Transporter A1. *Diabetes* 51: 2922–2928, 2002, 51, 7.
- Valdivieso, A. G., Clauzure, M., Marin, M. C., Taminelli, G. L., Massip Copiz, M. M., Sanchez, F., . . . Santa-Coloma, T. A. (2012). The mitochondrial complex I activity is reduced in cells with impaired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) function. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, 7(11), e48059. doi:10.1371/journal.pone.0048059
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1), 44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Valle, I., Alvarez-Barrientos, A., Arza, E., Lamas, S., & Monsalve, M. (2005). PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 66(3), 562-573. doi:10.1016/j.cardiores.2005.01.026
- Van Biervliet, S., Van Biervliet, J. P., Robberecht, E., & Christophe, A. (2010). Fatty acid composition of serum phospholipids in cystic fibrosis (CF) patients with or without CF related liver disease. *Clin Chem Lab Med*, 48(12), 1751-1755. doi:10.1515/CCLM.2010.336
- Velsor, L. W., Kariya, C., Kachadourian, R., & Day, B. J. (2006). Mitochondrial oxidative stress in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 35(5), 579-586. doi:10.1165/rcmb.2005-0473OC
- Venglarik, C. J., Bridges, R. j., & Frizzell, R. A. (1990). A simple assay for agonist-regulated Cl and K conductances in salt-secreting epithelial cells. *The American physiological society*(0363-6143/ 90), 7.
- Verhaege, C. (2007). Etude des mécanismes moléculaires responsables d'un état inflammatoire intrinsèque dans la mucoviscidose. *Liège: Université de Liège*.
- Vidović, D., Carlon, M. S., da Cunha, M. F., Dekkers, J. F., Hollenhorst, M. I., Bijvelds, M. J., . . . Baekelandt, V. (2016). rAAV-CFTR Δ R rescues the cystic fibrosis phenotype in human intestinal organoids and cystic fibrosis mice. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 193(3), 288-298.
- Wainwright, C. E., Elborn, J. S., Ramsey, B. W., Marigowda, G., Huang, X., Cipolli, M., . . . Flume, P. A. (2015). Lumacaftor–ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. *New England Journal of Medicine*, 373(3), 220-231.

Wang, X., Venable, J., LaPointe, P., Hutt, D. M., Koulov, A. V., Coppinger, J., . . . Balch, W. E. (2006). Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell*, *127*(4), 803-815. doi:10.1016/j.cell.2006.09.043

Waters, D. L., Dorney, S. F. A., Gaskin, K. J., Gruca, M. A., O'Halloran, M., & Wilcken, B. (1988). Pancreatic function in infants identified as having cystic fibrosis in a neonatal screening program. *The new england journal of medicine and Health*, *322*(5), 6.

Watmough, N. J., & Frerman, F. E. (2010). The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta*, *1797*(12), 1910-1916. doi:10.1016/j.bbabi.2010.10.007

Weber, A. M., & Roy, C. C. (1984). Intraduodenal events in Cystic Fibrosis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, *7*.

Weizman, Z., P R Durie, P. R., Kopelman, H. R., Vesely, S. M., & G.G., F. (1986). Bile acid secretion in cystic fibrosis: evidence for a defect unrelated to fat malabsorption. *Gut*, *27*, 7.

Werlin, S. L., Benuri-Silbiger, I., Kerem, E., Adler, S. N., Goldin, E., Zimmerman, J., . . . Wilschanski, M. (2010). Evidence of intestinal inflammation in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, *51*(3), 304-308. doi:10.1097/MPG.0b013e3181d1b013

Werner, A., Havinga, R., Bos, T., Bloks, V. W., Kuipers, F., & Verkade, H. J. (2005). Essential fatty acid deficiency in mice is associated with hepatic steatosis and secretion of large VLDL particles. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology*, *288*(6), G1150-1158. doi:10.1152/ajpgi.00456.2004

Wier, H. A., & Kuhn, R. J. (2011). Pancreatic enzyme supplementation. *Curr Opin Pediatr*, *23*(5), 541-544. doi:10.1097/MOP.0b013e32834a1b33

Wikstrom, J. D., Twig, G., & Shirihai, O. S. (2009). What can mitochondrial heterogeneity tell us about mitochondrial dynamics and autophagy? *Int J Biochem Cell Biol*, *41*(10), 1914-1927. doi:10.1016/j.biocel.2009.06.006

Wilschanski, M., Miller, L., Shoseyov, D., Blau, H., Rivlin, J., Aviram, M., . . . Pugatch, T. (2011). Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*, *38*(1), 59-69.

Wilschanski, M., Zielenski, J., Markiewicz, D., Tsui, L. C., Corey, M., Levison, H., & Durie, P. R. (1995). Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *Journal of Pediatrics*, *127*(5), 705-710.

Wilson, D. C., Rashid, M., Durie, P. R., Tsang, A., Kalnins, D., Andrew, M., . . . Pencharz, P. B. (2001). Treatment of vitamin K deficiency in cystic fibrosis: effectiveness of a daily fat-soluble vitamin combination. *The journal of pediatrics*, 138(6), 851-855.

Wine, J. J. (2001). Cystic fibrosis: The 'bicarbonate before chloride' hypothesis. *Current Biology*, 11, 4.

Winklhofer-Roob, B. M., Puhl, H., Khoschsorur, G., Van't Hof, M. A., Ester-Bauer, H., & Shmerling, D. H. (1995). Enhanced resistance to oxidation of low density lipoproteins and decreased lipid peroxide formation during beta-carotene supplementation in cystic fibrosis *Free Radic Biol Med*, 18(5), 11.

Wood, L. G., Fitzgerald, D. A., & Garg, M. L. (2003). Hypothesis: Vitamin E Complements Polyunsaturated Fatty Acids in Essential Fatty Acid Deficiency in Cystic Fibrosis. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(4), 5.

Wood, L. G., Fitzgerald, D. A., Gibson, P. G., Cooper, D. M., Collins, C. E., & Garg, M. L. (2001). Oxidative Stress in Cystic Fibrosis: Dietary and Metabolic Factors. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(2), 9.

Wood, L. G., Fitzgerald, D. A., Lee, A. K., & Garg, M. L. (2003). Improved antioxidant and fatty acid status of patients with cystic fibrosis after antioxidant supplementation is linked to improved lung function. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 10.

Wouthuyzen-Bakker, M., Bodewes, F. A., & Verkade, H. J. (2011). Persistent fat malabsorption in cystic fibrosis; lessons from patients and mice. *J Cyst Fibros*, 10(3), 150-158. doi:10.1016/j.jcf.2011.03.008

Wu, W., Sun, M., Chen, F., Cao, A., Liu, H., Zhao, Y., . . . Zhao, Q. (2016). Microbiota metabolite short-chain fatty acid acetate promotes intestinal IgA response to microbiota which is mediated by GPR43. *Mucosal Immunology*.

Wurm, C. A., & Jakobs, S. (2006). Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Lett*, 580(24), 5628-5634. doi:10.1016/j.febslet.2006.09.012

Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(1), 47-59.

Zabner, J., Smith, J. J., Karp, P. H., Widdicombe, J. H., & Welsh, M. J. (1998). Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro. *Mol Cell*, 2(3), 397-403.

Zentler- Munro, P., Fitzpatrick, W. J., BATTEN, J. C., & Northfield, T. C. (1984). Effect of intrajejunal acidity on aqueous phase bile acid and lipid concentrations in pancreatic steatorrhoea due to cystic fibrosis. *Gut*500-507, 25, 9.

ZERBATO, M. (2009). *Intérêt du dosage par microméthode de la Protéine C Réactive au cabinet de pédiatrie*. Thèse de doctorat d'université: Faculté de pharmacie. Nancy I: Université Henri Poincaré. France. 2010. 73p.

Zhou, Z., Wang, X., Liu, H. Y., Zou, X., Li, M., & Hwang, T. C. (2006). The two ATP binding sites of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) play distinct roles in gating kinetics and energetics. *J Gen Physiol*, 128(4), 413-422. doi:10.1085/jgp.200609622

Zirbes, J., & Milla, C. E. (2009). Cystic fibrosis related diabetes. *Paediatr Respir Rev*, 10(3), 118-123; quiz 123. doi:10.1016/j.prrv.2009.04.004