

Université de Montréal

Stratégies thérapeutiques favorisant l'intégrité fonctionnelle de l'épithélium des voies aériennes  
en fibrose kystique

*Par*

Benjamin Orcese

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences

en Sciences biomédicales, option Médecine expérimentale

avril 2023

© Benjamin Orcese, 2023

Université de Montréal

Faculté de Médecine

---

*Ce mémoire intitulé*

**Stratégies thérapeutiques favorisant l'intégrité fonctionnelle de l'épithélium des voies  
aériennes en fibrose kystique**

*Présenté par*

**Benjamin Orcese**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Claude Perreault**

Président-rapporteur

**Emmanuelle Brochiero**

Directrice de recherche

**François Malouin**

Membre du jury

## Résumé

La fibrose kystique (FK), causée par des mutations dans le gène codant pour le canal chlorure CFTR, est caractérisée par des infections bactériennes chroniques des voies aériennes (VA), impliquant en particulier *Pseudomonas aeruginosa* (PA) et *Staphylococcus aureus* (SA). Les facteurs de virulence (VirF) sécrétés par celles-ci sont responsables de la destruction progressive des VA et altèrent la capacité de réparation du tissu épithélial. Il existe cependant des molécules spécifiques permettant de corriger le défaut de CFTR et de moduler l'activité de canaux potassiques, deux actions qui pourraient favoriser la réparation épithéliale de par leur action. Leur efficacité pourrait toutefois être altérée par les VirF de *P. aeruginosa* ou *S. aureus*. Mon objectif a été d'identifier le potentiel de réparation épithélial du Trikafta et du ML277, modulateurs respectivement spécifiques des canaux CFTR et KvLQT1 (canal potassique sensible au voltage, du syndrome du QT long), impliqués dans les processus de réparation.

Des cultures primaires de cellules bronchiques des VA de patients FK ont été traitées avec la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta, l'activateur de KvLQT1 ML277, et la combinaison de ces deux derniers, en plus d'être exposées aux VirF de cultures de *P. aeruginosa* ou *S. aureus*. L'efficacité de ces traitements sur les processus de réparation fut évaluée, suite à des lésions, selon la vitesse de réparation des plaies, la prolifération cellulaire et les dynamiques de migration guidée cellulaire.

Les VirF de *P. aeruginosa* et *S. aureus* altèrent la vitesse de fermeture lésionnelle, la prolifération cellulaire et les dynamiques de migration cellulaire. Les traitements Trikafta et ML277 permettent cependant d'améliorer ces processus de la réparation épithéliale, et ce, en absence comme en présence des VirF bactériens nocifs à la réparation. La combinaison du Trikafta et du ML277 n'amène cependant pas l'effet additif espéré sur la réparation épithéliale. Ces résultats témoignent finalement de l'effet bénéfique du Trikafta et du ML277 sur la réparation épithéliale malgré la condition infectieuse, favorisant l'intégrité fonctionnelle de l'épithélium des VA FK.

**Mots-clés :** Fibrose kystique, infections bactériennes, lésions épithéliales, transport ionique membranaire, réparation épithéliale, nouvelles avenues thérapeutiques

## Abstract

Cystic fibrosis (CF), caused by mutations in the gene coding for the chloride channel CFTR, is characterized by chronic bacterial infections in the airways, particularly by *Pseudomonas aeruginosa* (PA) and *Staphylococcus aureus* (SA). The virulence factors (VirF) secreted by these bacteria are responsible for the progressive destruction of the airways and impair the repair process of the epithelia. Nevertheless, there are specific molecules that correct the CFTR defect and modulate potassium channel activity, both of which could be beneficial at promoting epithelial repair. However, their efficacy could be altered by *P. aeruginosa* or *S. aureus* VirF. My objective was to identify the repair potential of Trikafta and ML277, respectively specific modulators of CFTR and KvLQT1 channels, involved in repair processes.

Primary cultures of airways epithelial cells from CF patients were treated with the triple combination of CFTR modulators Trikafta, the KvLQT1 activator ML277, and the combination of the latter two, in addition to being exposed to VirF from *P. aeruginosa* or *S. aureus* cultures. The efficacy of these treatments on repair processes was evaluated, following wound injury, by the rate of wound repair, cell proliferation and guided cell migration dynamics.

*P. aeruginosa* and *S. aureus* VirF alter wound repair rates, cell proliferation and cell migration dynamics. Nevertheless, Trikafta and ML277 treatments improve these epithelial repair processes, both in the absence and presence of repair-damaging *P. aeruginosa* or *S. aureus* VirF. However, the combination of Trikafta and ML277 did not have the hoped-for additive effect on epithelial repair. Overall, these results show the beneficial effect of Trikafta and ML277 epithelial repair despite the infectious condition, promoting the functional integrity of the CF airways epithelia.

**Keywords:** Cystic fibrosis, bacterial infections, epithelial damage, membrane ion transport, epithelial repair, new therapeutic avenues

# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	10
Liste des figures.....	11
Liste des sigles et abréviations.....	14
Remerciements.....	19
Chapitre 1 – Introduction.....	20
1.1 L'appareil respiratoire.....	20
1.1.1 Anatomie et fonctions du système respiratoire.....	20
1.1.2 Histologie de l'épithélium des voies aériennes.....	22
1.1.3 Transport ionique transépithélial aux voies aériennes.....	25
1.1.3.1 Transport sodique.....	25
1.1.3.2 Transport potassique.....	25
1.1.3.2.1 Canal KvLQT1.....	26
1.1.3.3 Transport chlorique.....	27
1.1.3.3.1 Canal CFTR.....	28
1.1.4 Fonctions de l'épithélium des voies aériennes.....	31
1.1.4.1 Clairance mucociliaire.....	32
1.1.4.2 Réponse inflammatoire.....	33
1.1.4.3 Réparation de l'épithélium.....	33
1.1.4.3.1 Protéines cytosquelettiques.....	35

1.1.4.3.2 Matrice extracellulaire et intégrines.....	36
1.1.4.3.3 Métalloprotéinases .....	36
1.1.4.3.4 Facteurs de croissance .....	37
1.1.4.3.5 Canaux ioniques .....	37
1.2 La fibrose kystique.....	40
1.2.1 Étiologie.....	40
1.2.1.1 Classe I.....	41
1.2.1.2 Classe II.....	42
1.2.1.3 Classe III.....	42
1.2.1.4 Classe IV.....	42
1.2.1.5 Classe V.....	43
1.2.1.6 Classe VI.....	43
1.2.2 Diagnostic et dépistage .....	44
1.2.3 Manifestations multisystémiques et aspects cliniques .....	46
1.2.4 Manifestations pulmonaires .....	47
1.2.4.1 Défaut de clairance mucociliaire.....	48
1.2.4.2 Infections bactériennes.....	49
1.2.4.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	50
1.2.4.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	51
1.2.4.3 Inflammation chronique .....	52
1.2.4.4 Dommages épithéliaux.....	52
1.2.5 Traitement de la maladie .....	55
1.2.5.1 Traitements symptomatiques.....	55
1.2.5.1.1 Traitements contre les infections bactériennes et l'inflammation .....	55

1.2.5.1.2 Traitements contre l'obstruction des voies aériennes .....	56
1.2.5.1.3 Traitements contre la malnutrition.....	56
1.2.5.1.4 Transplantation pulmonaire .....	57
1.2.5.2 Traitements à l'étude .....	57
1.2.5.3 Modulateurs de CFTR .....	59
1.2.5.3.1 Monothérapie Kalydeco .....	61
1.2.5.3.2 Bithérapies Orkambi et Symdeko.....	61
1.2.5.3.3 Trithérapie Trikafta .....	62
1.2.5.3.4 Modulateurs de CFTR à l'étude.....	63
1.2.5.3.5 Défis à relever .....	63
1.2.5.4 Nouvelles avenues thérapeutiques.....	64
Chapitre 2 – Hypothèses et objectifs .....	66
Chapitre 3 – Matériel et méthodes.....	68
3.1 Collecte des données et échantillons humains suite aux transplantations pulmonaires....	68
3.1.1 Approbation du comité d'éthique de la recherche (CER) au Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) .....	68
3.1.2 Bases de données.....	68
3.1.3 Sélection des cellules primaires épithéliales bronchiques .....	68
3.1.4 Collecte et dissection des explants pulmonaires de patients FK et tissus de donneurs sains lors des transplantations pulmonaires.....	69
3.2 Isolation des cellules primaires épithéliales bronchiques .....	70
3.3 Culture des cellules primaires épithéliales bronchiques .....	71
3.4 Traitement des cultures primaires épithéliales bronchiques .....	72
3.5 Culture bactérienne de la souche clinique de <i>P. aeruginosa</i> PACF508 .....	73

3.6 Culture bactérienne de la souche clinique de <i>S. aureus</i> SA29213 .....	73
3.7 Traitements avec la combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta et avec l'activateur de KvLQT1 ML277.....	74
3.8 Lésions mécaniques et réparation épithéliale .....	74
3.9 Évaluation de la prolifération cellulaire au sein d'une monocouche en réparation par immunomarquage.....	75
3.10 Analyse quantitative de la prolifération cellulaire .....	76
3.11 Migration guidée cellulaire .....	76
3.12 Analyses statistiques .....	78
Chapitre 4 – Résultats .....	79
4.1 Effets de la combinaison Trikafta sur les processus de réparation de cultures primaires bronchiques de patients FK F508del homozygotes .....	79
4.2 Effets de la combinaison Trikafta sur les processus de réparation de cultures primaires bronchiques de patients FK F508del hétérozygotes.....	87
4.3 Effets du ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires bronchiques de patients FK F508del hétérozygotes.....	93
4.4 Effets de la combinaison du Trikafta et du ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires bronchiques de patients FK hétérozygotes F508del/classe I .....	99
4.5 Effets du ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires bronchiques d'un patient FK inéligible au Trikafta .....	105
4.6 Effets du ML277 sur la réparation de cultures primaires bronchiques de donneurs sains .....	107
Chapitre 5 – Discussion .....	114
5.1 Retour sur les résultats .....	114
5.1.1 Conséquences des infections bactériennes sur la réparation de l'épithélium .....	115

5.1.2 Effets des stratégies thérapeutiques sur la réparation épithéliale en condition infectieuse .....	117
5.1.2.1 Effet de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta .....	117
5.1.2.2 Effet de l'activateur de KvLQT1 ML277 .....	118
5.1.2.3 Stratégie combinatoire avec le Trikafta et le ML277 .....	120
5.2 Implications cliniques .....	120
5.3 Limitations expérimentales .....	122
5.4 Perspectives .....	124
5.5 Conclusions .....	125
Références bibliographiques .....	126

## Liste des tableaux

Tableau 1. –	Accessibilité des modulateurs de CFTR en 2020 selon la FDA (182).....	60
--------------	---	----

## Liste des figures

Figure 1. – Anatomie de l'appareil respiratoire (4).....	21
Figure 2. – Histologie des voies conductrices et respiratoires de l'appareil respiratoire (3) ....	24
Figure 3. – Structure 2D du canal potassique KvLQT1 .....	26
Figure 4. – Structure 2D du canal chlorique CFTR.....	28
Figure 5. – Modélisation de l'activation du canal chlorique CFTR.....	29
Figure 6. – Échanges ioniques transépithéliaux dans les cellules des VA, responsables des mouvements liquidiens .....	31
Figure 7. – Processus de réparation après lésion épithéliale .....	35
Figure 8. – Mode de transmission de la FK (78).....	41
Figure 9. – Classification des mutations de CFTR (82) .....	43
Figure 10. – Transports impliqués dans les variations de l'ASL en condition saine et FK.....	48
Figure 11. – Prévalence des infections respiratoires selon l'âge (72).....	49
Figure 12. – Classes de mutations CFTR et stratégies thérapeutiques correspondantes (83)	59
Figure 13. – Exemple de suivis unitaires de cellules d'une zone en bord de plaie pendant 12 heures de réparation (gauche) et paramètres de migration guidée obtenus par ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool : distance et vitesse de migration, angle de migration, et déviation par rapport au sens de migration (droite). .....	77
Figure 14. – Effet de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur la fermeture de lésions de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK F508del homozygotes.....	80
Figure 15. – Effet de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur la prolifération de cultures de cellules épithéliales bronchiques de patients FK F508del homozygotes en cours de réparation.....	81
Figure 16. – Effet de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur la migration guidée de cultures de cellules épithéliales bronchiques de patients FK F508del homozygotes en cours de réparation. ....	82

Figure 17. – Effets de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK F508del homozygotes en présence des VirF de <i>P. aeruginosa</i> . .....	84
Figure 18. – Effets de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK F508del homozygotes en présence des VirF de <i>S. aureus</i> . .....	86
Figure 19. – Effets de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I). .....	88
Figure 20. – Effets de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I) en présence des VirF de <i>P. aeruginosa</i> . .....	90
Figure 21. – Effets de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I) en présence des VirF de <i>S. aureus</i> . .....	92
Figure 22. – Effets de l'activateur de KvLQT1 ML277, sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I). .....	94
Figure 23. – Effets de l'activateur de KvLQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I) en présence des VirF de <i>P. aeruginosa</i> . .....	96
Figure 24. – Effets de l'activateur de KvLQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I) en présence des VirF de <i>S. aureus</i> . .....	98
Figure 25. – Effets de l'association de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta et de l'activateur de KvLQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I). .....	100
Figure 26. – Effets de l'association de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta et de l'activateur de KvLQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de	

cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I) en présence des VirF de <i>P. aeruginosa</i> . .....	102
Figure 27. – Effets de l'association de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta et de l'activateur de KvLQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I) en présence des VirF de <i>S. aureus</i> .....	104
Figure 28. – Effets de l'activateur de KvLQT1 ML277 sur la fermeture de lésions dans des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques d'un patient FK porteur de mutations de classe I, en présence ou non des VirF de <i>P. aeruginosa</i> ou <i>S. aureus</i> .....	106
Figure 29. – Effets de l'activateur de KvLQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de donneurs sains. ....	108
Figure 30. – Effets de l'activateur de KvLQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de donneurs sains en présence des VirF de <i>P. aeruginosa</i> .....	110
Figure 31. – Effets de l'activateur de KvLQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de donneurs sains en présence des VirF de <i>S. aureus</i> .....	112

## Liste des sigles et abréviations

AAV	adeno-associated virus
ABC	ATP-binding cassette
ACK	ammonium-chloride-potassium
ADP	adénosine diphosphate
Agr	accessory gene regulator
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
AQP	aquaporine
ASL	liquide de surface des voies aériennes
ATP	adénosine triphosphate
BEBM	bronchial epithelial cell basal medium
BEGM	bronchial epithelial cell growth medium
BKCa	canal potassique à large conductance, sensible au calcium intracellulaire
BSA	bovine serum albumin
Ca <sup>2+</sup>	calcium
CaCC	canal chlorique sensible au calcium intracellulaire
CBC	complexe <i>Burkholderia cepacia</i>
CER	comité d'éthique de la recherche
CFBE	cystic fibrosis bronchial epithelial cell line
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CFU	unité formant colonie
CHUM	centre hospitalier de l'Université de Montréal
Cl <sup>-</sup>	chlorure
CLR	récepteurs de lectine de type C
CMC	clairance mucociliaire

CRCHUM	centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal
DAMP	motif moléculaire associé aux dégâts
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	diméthylsulfoxyde
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EGF	facteur de croissance épidermique
EGFR	récepteur de facteur de croissance épidermique
ENaC	canal sodique épithélial (epithelial sodium channel)
ERAD	dégradation des protéines associées au réticulum endoplasmique
ExoA	Exotoxine A
ExoT	Exotoxine T
FBS	fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FGF	facteur de croissance des fibroblastes
FK	fibrose kystique
GI	gastro-intestinal
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	bicarbonate
HGF	facteur de croissance des hépatocytes
H1a	Hémolysine alpha
H1b	Hémolysine bêta
IAL	interface air-liquide
ICM	intestinal current measurement
IL	interleukine
IMC	indice de masse corporelle
IP	insuffisance pancréatique
K <sup>+</sup>	potassium

K <sub>ATP</sub>	canal potassique sensible à l'ATP
Kb	kilobase
KCa	canal potassique sensible au calcium intracellulaire
KCNE	sous-unité régulatrice du canal potassique KvLQT1
KGF	facteur de croissance des kératinocytes
Kir	canal potassique à rectification entrante
Kv	canal potassique sensible au voltage
KvLQT1	canal potassique sensible au voltage, du syndrome du QT long
LB	lysogeny broth
MEC	matrice extracellulaire
MEM	minimal essential medium
miARN	micro-ARN
MMP	métalloprotéinase
MMP-7	matrilysine
MPOC	maladie pulmonaire obstructive chronique
MSD	domaine transmembranaire
Na <sup>+</sup>	sodium
NBD	domaine de liaison à l'ATP
NKCC	co-transporteur Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup>
NLR	récepteurs de type NOD
NMD	nonsense-mediated mRNA decay
NPD	nasal potential difference
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	motif moléculaire associé aux agents pathogènes
PBS	phosphate-buffered saline
PCL	liquide périciliaire
PCLS	precision-cut lung slices
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEP	pression expiratoire positive

PFA	paraformaldéhyde
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PRR	récepteurs de reconnaissance de formes
pS	picosiemens
PTC	codon de terminaison prématuré
P24	plaque de 24 puits
QS	quorum sensing
QQ	quorum quenching
RE	réticulum endoplasmique
RLR	récepteurs de type RIG-I
RM	repeated measures
RPM	rotations par minute
RTE	résistance transépithéliale
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SCVs	small-colony variants
SEM	standard error of the mean
SQTL	syndrome du QT long
STM	segment transmembranaire
TA	température ambiante
Task	Twik-related acid-sensitive potassium channel
TEM	transition épithélio-mésenchymateuse
TIR	trypsine immunoréactive
TLR	récepteurs de type Toll
TNF	facteur de nécrose tumoral
Trek	Twik-related potassium channel
Twik	canal potassique Twik à deux domaines pore
T75	flasque de culture cellulaire de 75cm <sup>2</sup>

UA	unité arbitraire
UPS	système ubiquitine-protéasome
VA	voies aériennes
VEMS	volume expiratoire maximal par seconde
VirF	facteurs de virulence
WB	immunobuvardage

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon jury. Merci à vous deux, Dr Claude Perreault et Dr François Malouin, d'accepter d'être membres de mon jury et de prendre le temps de corriger mon mémoire.

Un sincère merci à ma directrice de recherche, Dre Emmanuelle Brochiero, qui a permis l'accomplissement de ce projet, et plus encore. Depuis le début de ma maîtrise, au sein de ton laboratoire comme au-delà de la science, j'en ai beaucoup appris sur le monde de la recherche, du travail, et surtout sur moi-même. Tu as contribué à cette évolution et je t'en remercie.

Ces remerciements seraient incomplets s'ils n'incluaient pas également Dr Damien Adam. Merci à toi Damien pour tous tes efforts, tes enseignements et surtout, ta joie de vivre au quotidien. Tu as été un pilier dans ma maîtrise et je n'en serais pas là sans toi.

Merci également à toutes ces personnes dont nos chemins se sont croisés et qui ont participé à l'accomplissement de ma maîtrise.

Merci à mes parents qui, même de l'autre bout du monde, n'ont jamais cessé d'être fiers de moi et de croire en leur fils.

Enfin, merci à mes ami.e.s. Vous représentez le soutien moral qui m'a permis d'avancer et d'en arriver jusque-là. Merci pour votre écoute, vos conseils et votre appui inconditionnel. Cela vous inclut, Sarah, Émilie et Mélissa. Merci d'avoir toujours été présentes, de m'avoir encouragé comme personne au long de ma maîtrise (et jusqu'à la toute fin), et d'être, au-delà de collègues, les bonnes amies que vous êtes.

# Chapitre 1 – Introduction

## 1.1 L'appareil respiratoire

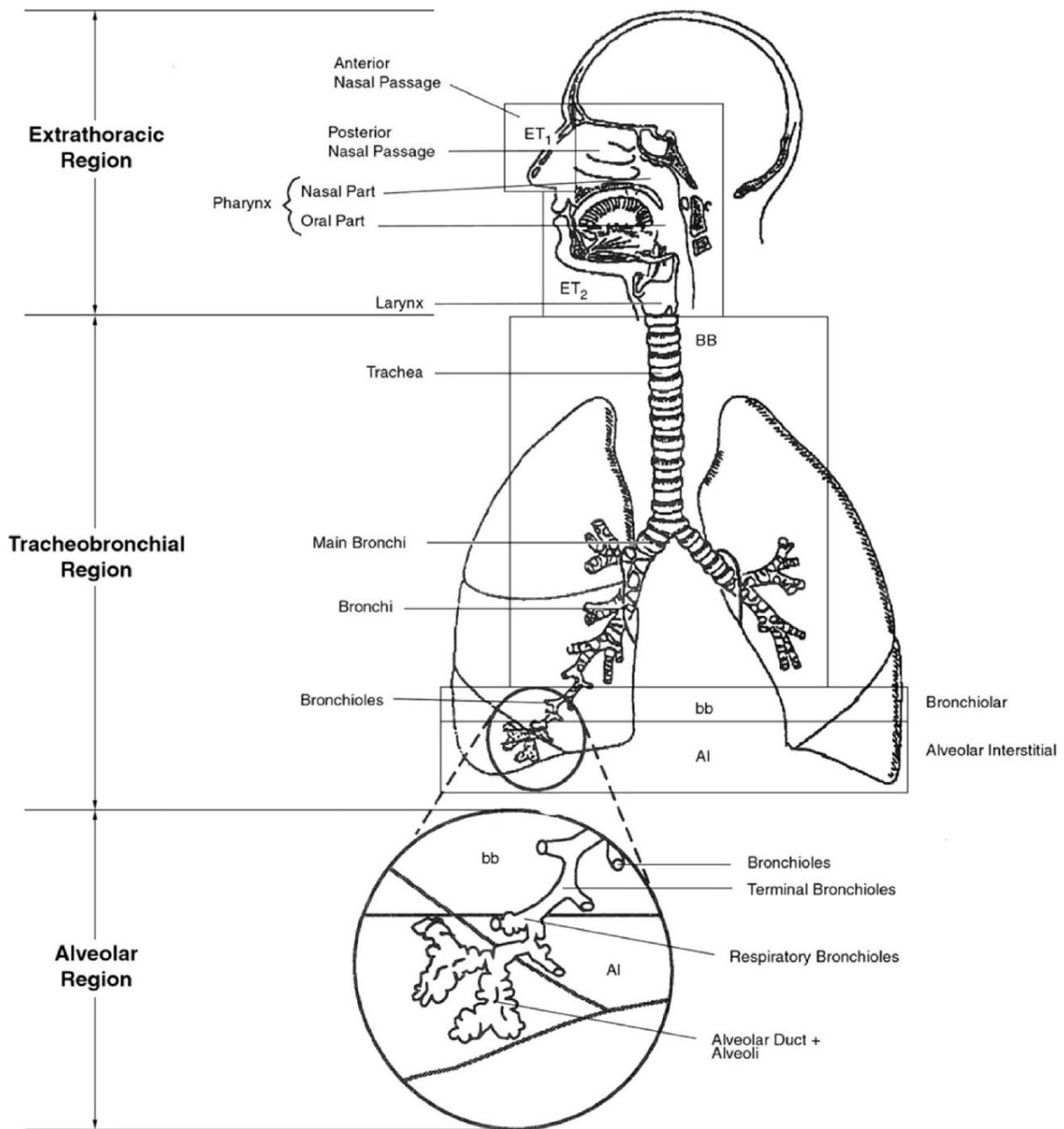
La respiration chez l'humain est assurée par l'appareil respiratoire divisé selon plusieurs ramifications, des voies aériennes (VA) aux alvéoles, qui permettent une oxygénation efficace de l'ensemble des organes du corps humain par échanges gazeux (1). En plus d'assurer la respiration, notre système respiratoire possède d'autres fonctions physiologiques essentielles afin d'assurer l'homéostasie et l'intégrité fonctionnelle de l'épithélium respiratoire, notamment par des mécanismes de défense contre les agressions extérieures contenues dans l'air inspiré (pathogènes, poussières, gaz irritants) (2). Ces fonctions sont rendues possibles grâce au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale et des fonctions spécifiques des cellules composant les différents épithéliums bordant les VA et les alvéoles (3).

### 1.1.1 Anatomie et fonctions du système respiratoire

L'appareil respiratoire est divisé fonctionnellement en deux portions : la première conductrice et la seconde respiratoire. La portion conductrice est composée, premièrement dans la région extrathoracique (voies supérieures), des cavités nasales, du pharynx et du larynx (Figure 1), assurant la première ligne de défense, par filtration, contre l'inhalation de polluants dans l'air, en plus de leurs fonctions de réchauffement et d'humidification de l'air (1,2). S'ensuit la région trachéo-bronchique (voies inférieures), composée de la trachée qui bifurque en deux bronches primaires, ramifiées subséquentement dans chaque poumon en bronches secondaires, préterminales et terminales, un ensemble responsable non seulement de la conduction de l'air inspiré vers la portion respiratoire, mais également de sa purification. La région alvéolaire (voies inférieures), composée des bronchioles respiratoires, des conduits et sacs alvéolaires, et finalement des alvéoles, permet les échanges gazeux afin d'oxygéner les organes (1,3).

Le nombre d'alvéoles chez un individu dépend de son volume pulmonaire, mais on en dénombre en moyenne un total de 480 millions, chacune étant entourée de nombreux capillaires sanguins

afin de permettre l'apport de dioxygène dans la circulation systémique par l'air inspiré, et le rejet du dioxyde de carbone dans l'air ensuite expiré (1).



**Figure 1. – Anatomie de l'appareil respiratoire (4)**

Divisions de l'appareil respiratoire selon les régions extrathoracique (portion conductrice; voies supérieures), trachéo-bronchique (portion conductrice; voies inférieures) et alvéolaire (portion respiratoire; voies inférieures).

Les fonctions d'intégrité de l'appareil respiratoire sont, quant à elles, assurées grâce à une différenciation épithéliale spécifique se produisant le long des subdivisions des VA.

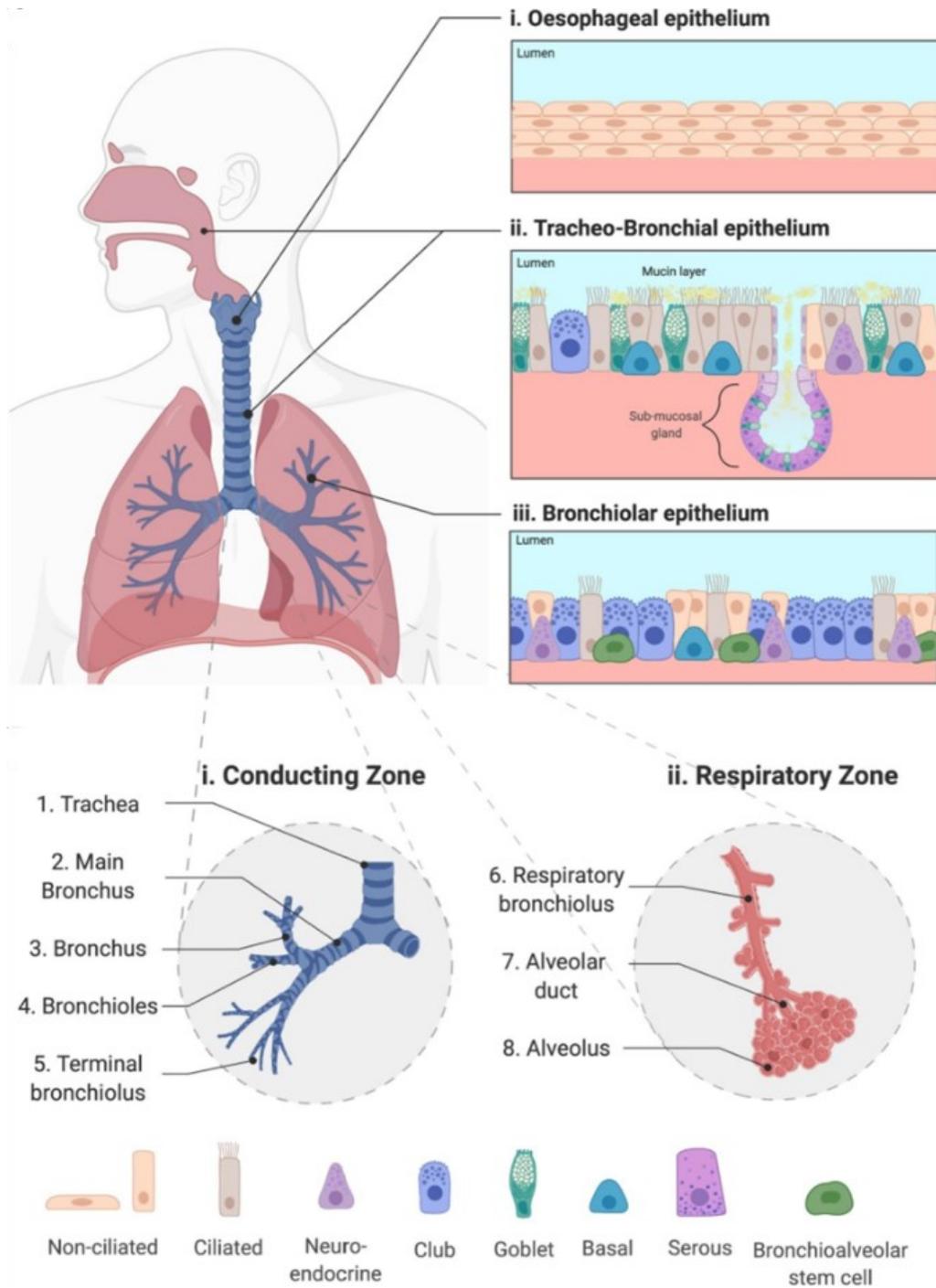
### **1.1.2 Histologie de l'épithélium des voies aériennes**

La ramification de l'appareil respiratoire mène à un amincissement progressif et une composition cellulaire transitoire des épithéliums constituant ces embranchements, afin que ces derniers puissent remplir leurs fonctions (1). Les cellules épithéliales des VA présentent des structures et fonctions spécifiques selon leur localisation dans l'appareil respiratoire (3) :

- Les cellules ciliées sont reconnaissables à leur forme allongée et aux cils couvrant leur côté apical, au nombre de 200 à 300 par cellule et d'environ 7  $\mu\text{m}$  de hauteur. Ces cils assurent, de par leur battement coordonné dans le liquide périciliaire (PCL), le déplacement du mucus emprisonnant les particules inspirées vers les voies supérieures afin qu'il soit éliminé (3). Les cellules ciliées expriment un ensemble de canaux et transporteurs, dont le canal chlorique CFTR (« cystic fibrosis transmembrane conductance regulator »), assurant un transport ionique, et secondement liquidien, ce tout permettant de maintenir un volume de PCL adéquat pour la fonction ciliaire. Les jonctions serrées et desmosomes présents entre ces cellules et celles adjacentes permettent également la formation d'une barrière physique imperméable (5).
- Les cellules caliciformes (goblet), de forme cylindrique, sont les cellules responsables de la production de mucus (en plus des glandes sous-muqueuses) dans la région trachéo-bronchique, de par leurs sécrétions de mucines (glycoprotéines) grâce à leurs granules sécrétoires présentes au niveau apical (5).
- Les cellules basales, petites et de forme triangulaire, aident à l'ancrage des cellules ciliées et caliciformes à la membrane basale, mais surtout à la régénération cellulaire, aussi bien normale qu'après une lésion, de par leur qualité de cellules progénitrices (3,5,6).
- Les cellules Club, en forme de dôme allongé, sont surtout présentes dans l'épithélium des bronchioles et y agissent en tant que cellules sécrétrices de mucines et surfactant, ainsi que cellules progénitrices lors de dommages épithéliaux (3).

- Les cellules neuroendocrines, petites et triangulaires, ont une fonction encore mal comprise, mais celle-ci pourrait être liée aux peptides qu'elles secrètent dans leurs granules neurosécrétrices (5).
- Les ionocytes, un type cellulaire récemment identifié, sont plus rares dans l'épithélium des VA (1-2% des cellules épithéliales) mais semblent avoir une contribution significative au transport ionique transépithélial, de par leur forte expression du canal chlorique CFTR (7–9).

La distribution des cellules épithéliales varie selon la région de l'appareil respiratoire (Figure 2). La différenciation des voies supérieures en voies inférieures mène à une transition d'un épithélium stratifié pavimenteux non kératinisé, composé de cellules non ciliées, à un épithélium pseudostratifié cylindrique cilié et muqueux, composé surtout de cellules ciliées, ainsi que de cellules caliciformes et glandes sous-muqueuses qui assurent la production de mucus. À mesure des ramifications, le nombre de cellules ciliées, caliciformes et basales diminue progressivement pour laisser place à un épithélium bronchiolaire composé surtout de cellules Club (3,5).



**Figure 2. – Histologie des voies conductrices et respiratoires de l'appareil respiratoire (3)**

À la surface membranaire des cellules épithéliales des VA sont présentes de multiples protéines de transport ionique, dont l'activité cohésive permet l'accomplissement des différentes fonctions d'intégrité des épithéliums des VA, essentielles à la physiologie du poumon (section 1.1.4).

### 1.1.3 Transport ionique transépithélial aux voies aériennes

C'est à partir des mouvements ioniques transépithéliaux que sont régulés les différents gradients électrochimiques et osmotiques essentiels à l'homéostasie liquidienne dans les poumons. Ces mouvements sont assurés grâce aux protéines de transport d'ions et de liquide (aquaporines, AQP) présentes à la membrane plasmique des cellules épithéliales, et plus particulièrement certains canaux sodiques, potassiques et chloriques, qui permettent ce maintien de l'équilibre ionique et hydrique (10).

#### 1.1.3.1 Transport sodique

Le mouvement des ions  $\text{Na}^+$  (sodium) est régulé par différentes protéines à la membrane cellulaire, telles que les co-transporteurs NKCC ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ ) et  $\text{Na}^+\text{/HCO}_3^-$ , mais il est principalement orchestré par le canal ENaC (canal sodique épithélial) apical, et la pompe  $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$  basolatérale. Ces deux derniers jouent un rôle majeur dans la régulation du gradient osmotique, contrôlant le mouvement liquidien au niveau épithélial (11). Ceci est plus particulièrement représenté au niveau alvéolaire où les cellules alvéolaires de type I et II, grâce à ces protéines de transport ionique à leur membrane, sont responsables de la réabsorption liquidienne. Ce phénomène est essentiel durant le développement des poumons où, à la fin de la grossesse, l'épithélium pulmonaire passe d'une activité de sécrétion à une absorption ionique, afin de réabsorber le liquide fœtal et permettre les échanges gazeux (12–14).

Dans les poumons développés, le transport sodique transépithélial consiste en l'absorption apicale du sodium par le canal ENaC, ensuite transporté du côté basolatéral par la pompe  $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$  (11). Ce mouvement ionique engendre un gradient osmotique qui mène à l'absorption des liquides (par voie paracellulaire et par les AQP à la surface des cellules alvéolaires). Ce déplacement est essentiel au maintien d'un environnement presque exempt de liquide au niveau alvéolaire, afin d'assurer les échanges gazeux (11,15).

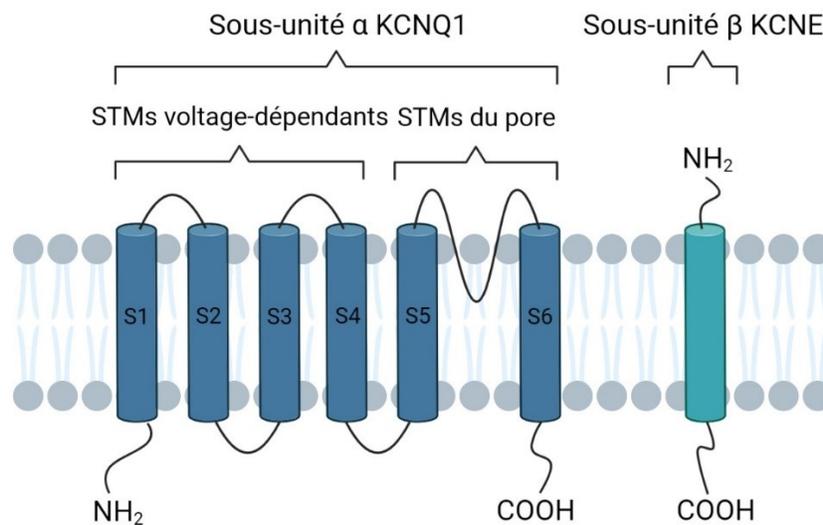
#### 1.1.3.2 Transport potassique

En plus de la pompe  $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$ , le mouvement transépithélial des ions  $\text{K}^+$  (potassium) est régulé par divers canaux potassiques, positionnés à la membrane apicale comme basolatérale des

cellules épithéliales. Ces canaux sont essentiels pour le contrôle du potentiel membranaire (11). Plus d'une centaine de canaux  $K^+$  ont été découverts, et on en dénombre parmi eux, plus d'une trentaine exprimés dans l'épithélium respiratoire (16). Ces derniers sont divisés en 3 classes selon le nombre de segments transmembranaires (STM) qui entrent dans leur composition : les canaux à 2 STM et à rectification entrante (Kir), ceux à 4 STM et 2 pores (Task, Trek, Twik), et ceux à 6 STM. Cette dernière classe comprend deux sous-groupes : les canaux activés par le calcium (KCa) (à l'exception de BKCa qui présente 7 STM), et ceux activés par les changements du potentiel membranaire (Kv), comme le KvLQT1 (16) qui contribue pour une large part de la conductance potassique au niveau de l'épithélium des VA (17).

#### 1.1.3.2.1 Canal KvLQT1

Le KvLQT1 (KCNQ1, Kv7.1) est un canal potassique voltage-dépendant de faible conductance (1,8-5,8 pS) activé par l'AMPC que l'on retrouve à la membrane des cellules épithéliales (18,19). Cette protéine, encodée par le gène *KCNQ1* du chromosome 11 et composée de 676 acides aminés, consiste en la sous-unité  $\alpha$  KCNQ1 liée à une de ses sous-unités  $\beta$  KCNE (Figure 3) (20).



**Figure 3. – Structure 2D du canal potassique KvLQT1**

Canal potassique KvLQT1 composé de sa sous-unité  $\alpha$  KCNQ1 à 6 STM (S1-S6) et de sa sous-unité  $\beta$  KCNE. Inspirée de Chen *et al.*, 2009, et créée avec BioRender.com.

Le canal KvLQT1 a premièrement été caractérisé pour son rôle au niveau des courants cardiaques (21), composé des sous-unités  $\alpha$  KCNQ1 et  $\beta$  KCNE1. Il a été découvert en 1997 à l'identification du gène causant le syndrome du QT long (SQTL), un trouble du rythme cardiaque dans lequel l'intervalle QT est prolongé (22). Ce retard de repolarisation, causé par des mutations du gène, peut provoquer une arythmie cardiaque, des torsades de pointe, ou ultimement un arrêt cardiaque (20).

Le canal KvLQT1 est également présent dans les VA, où il est constitué des sous-unités  $\alpha$  KCNQ1 et  $\beta$  KCNE2 ou KCNE3 (23). Il contribue, avec les canaux KCa et  $K_{ATP}$ , au transport potassique responsable du maintien du potentiel membranaire dans les cellules épithéliales des VA, un gradient électrochimique permettant d'assurer l'absorption sodique et la sécrétion chlorique à la membrane apicale des cellules (11,18,23). La fonction de KvLQT1 réside deuxièmement dans la régulation de l'expression des canaux ENaC et CFTR, et donc ultimement dans le contrôle du transport transépithélial des ions  $Na^+$  et  $Cl^-$  (chlorure) (24–27). Enfin, le canal KvLQT1 joue un rôle essentiel à la physiologie pulmonaire : comme expliqué plus tard (section 1.1.4.3.5), les canaux potassiques contribuent également à la régulation des processus de migration, prolifération et réparation épithéliale (27–30).

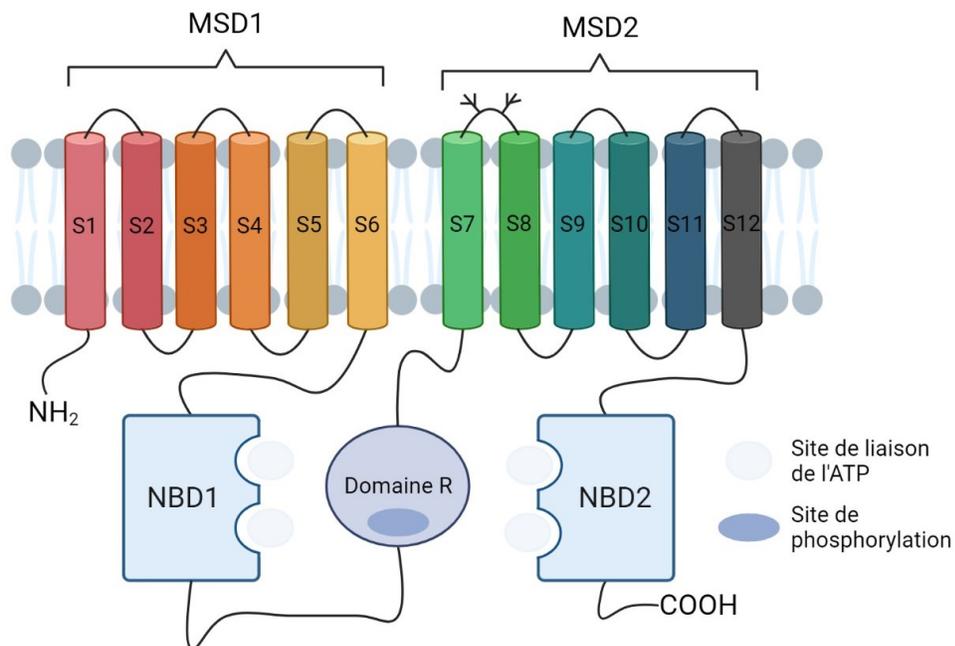
### 1.1.3.3 Transport chlorique

Le mouvement des ions  $Cl^-$  dans les cellules épithéliales des VA est assuré par plusieurs protéines, comme les canaux chloriques CFTR et ANO1 (TMEM16A), le transporteur SLC26A9, et les co-transporteurs NKCC et  $Cl^-HCO_3^-$  (9,11). Comparativement à la contribution moindre des autres protéines de transport chlorique apicales, le canal CFTR représente l'acteur majeur de la sécrétion chlorique dans les VA, en plus du transport transépithélial des ions bicarbonate ( $HCO_3^-$ ) et autres anions qu'il assure également (9,11,31,32). Le rôle essentiel du transport chlorique s'illustre par exemple pendant le développement des poumons, où les mouvements ioniques et hydriques sécrétoires dans la région alvéolaire sont principalement assurés via une sécrétion de  $Cl^-$ , afin d'exercer une pression favorisant une croissance pulmonaire optimale chez le fœtus, avant de transitionner vers des mouvements d'absorption ioniques et hydriques (33). À l'âge adulte, la sécrétion chlorique qu'assurent les canaux CFTR dans les poumons développés permet de

balancer l'absorption sodique présente et ainsi maintenir un volume liquidien adéquat au battement des cils à la surface des cellules (9) (voir à la suite de la section).

#### 1.1.3.3.1 Canal CFTR

La protéine CFTR, de faible conductance (6-10 pS), est codée par le gène *CFTR* situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31.2), de 250 Kb de longueur et possédant 27 exons (34,35). Composée de 1480 acides aminés, sa structure à 5 domaines comprend, de l'extrémité N-terminale à celle C-terminale, un premier domaine transmembranaire composé de 6 STM (MSD1), un premier domaine de liaison à l'ATP (NBD1), un domaine régulateur R, puis un 2<sup>e</sup> domaine transmembranaire à 6 STM (MSD2), et finalement un 2<sup>e</sup> domaine de liaison à l'ATP (NBD2) (36). Ces domaines remplissent des fonctions distinctes : les MSD forment le pore du canal (avec les STM et les boucles intracellulaires), les NBD contrôlent son ouverture par liaison et hydrolyse d'ATP, et le domaine R détermine son activité, de par sa phosphorylation qui permet le rapprochement des NBD et la formation des deux sites de liaison à l'ATP (Figure 4) (35).

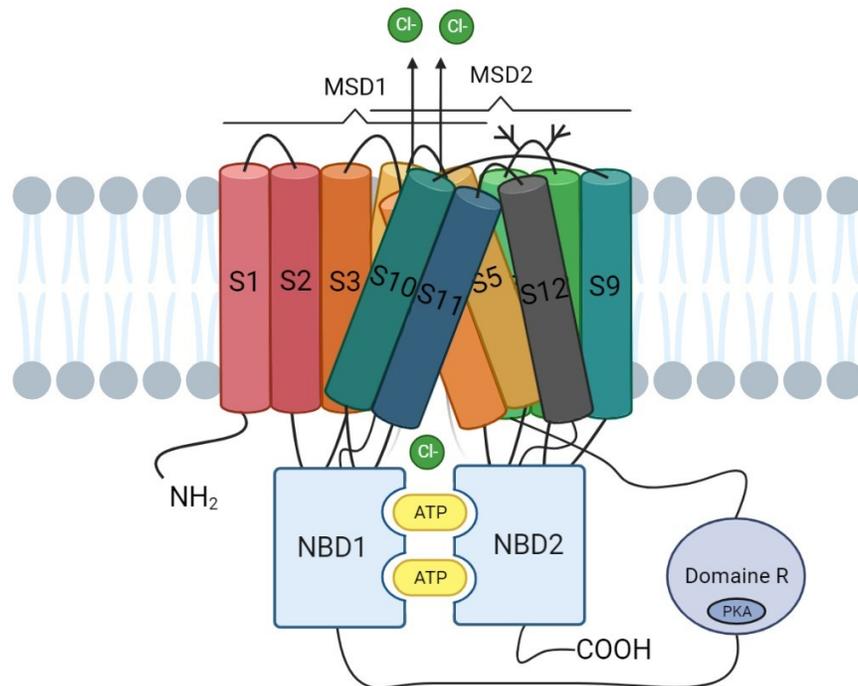


**Figure 4. – Structure 2D du canal chlorure CFTR**

MSD : domaine transmembranaire; NBD : domaine de liaison de l'ATP; Domaine R : domaine de régulation; S1-S12 : segments transmembranaires. Inspirée de Lopes-Pacheco, 2016, et de McDonald *et al.*, 2021, et créée avec BioRender.com.

Les structures NBD, et l'hydrolyse de l'ATP par ces derniers, vaut au canal CFTR sa place dans la famille des transporteurs ABC (« ATP-binding cassette »), chez qui cette protéine représente un unique membre : elle est la seule dont la production crée un canal ionique, et donc l'activité ne dépend pas uniquement de l'hydrolyse d'ATP (35,36).

La régulation du canal CFTR est complexe, requérant en effet la présence de plusieurs éléments comme l'ATP, ou l'activité phosphatase ou kinase qui dépend de l'AMPc, d'où la caractéristique AMPc-dépendante du canal (35). L'ouverture de la protéine est premièrement réglée par la phosphorylation du domaine R par la PKA (protéine kinase A) ou la PKC (protéine kinase C) (Figure 5). Une fois phosphorylé, le domaine R permet la dimérisation des deux domaines de liaison de l'ATP NBD1 et NBD2, révélant une conformation « tête-à-queue » qui permet la liaison de l'ATP, puis son hydrolyse en ADP au niveau intracellulaire. Cette réaction mène à des changements conformationnels des STM pour permettre l'ouverture du canal, et donc la sécrétion d'ions Cl<sup>-</sup> au niveau extracellulaire (35,36).



**Figure 5. – Modélisation de l'activation du canal chlorure CFTR**

MSD : domaine transmembranaire; NBD : domaine de liaison de l'ATP; Domaine R : domaine de régulation; S1-S12 : segments transmembranaires; Cl<sup>-</sup> : ions chlorure. Inspirée de Rogan *et al.*, 2011, et de McDonald *et al.*, 2021, et créée avec BioRender.com.

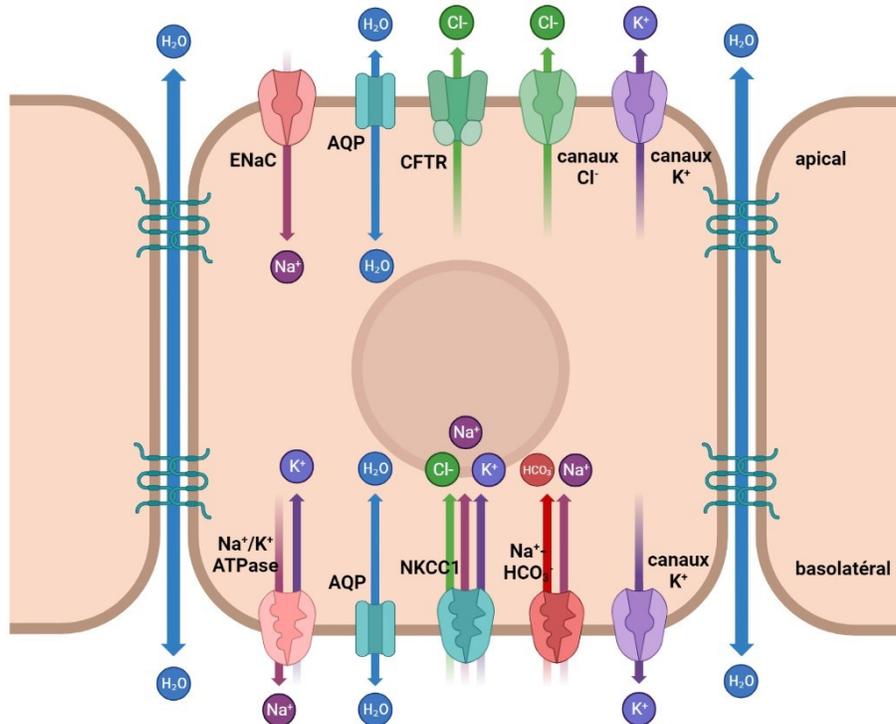
La protéine CFTR est soumise à un processus complexe de maturation afin d'atteindre la membrane plasmique de la cellule. Premièrement, la synthèse et le repliement de la protéine sont réalisés progressivement dans le réticulum endoplasmique (RE), domaine par domaine (MSD1-NBD1-domaine R-MSD2-NBD2) (32). Une fois le dernier domaine NBD2 de CFTR synthétisé, s'ensuit le processus de maturation de la protéine : lorsque bien assemblée et adéquatement repliée, elle est transportée par des chaperonnes cytoplasmiques à l'appareil de Golgi pour sa glycosylation. La protéine CFTR finalement mature est alors transportée par vésicules sécrétoires à la membrane plasmique apicale de la cellule pour y exercer sa fonction de canal. CFTR possède une demi-vie de 12 à 24 heures et est renouvelé à un taux de 10% par minute, son internalisation étant réalisée par des endosomes pour procéder à son recyclage ou sa dégradation (32,37).

Ce processus complet est cependant sujet à des erreurs dans les différentes étapes décrites. Les protéines CFTR sont alors soumises à un contrôle de qualité rigoureux afin d'assurer que seules celles correctement assemblées atteignent la membrane (32). Une protéine CFTR mal repliée est reconnue par les protéines chaperonnes du RE afin d'être dégradée par le système de dégradation des protéines associée au RE (ERAD), qui implique le système ubiquitine-protéasome (UPS). Ce dernier s'assure de la qualité de maturation de CFTR dans la membrane du RE et dans le cytoplasme, et donc de l'ubiquitination d'une protéine CFTR mal repliée afin qu'elle soit délivrée au protéasome pour être dégradée, au lieu d'être transportée à la membrane (32,37).

À la différence de sa fonction de réabsorption dans les cellules alvéolaires (38,39), le canal CFTR assure une sécrétion chlorique dans les cellules épithéliales des VA (principalement les cellules sécrétoires, ainsi que celles basales, ciliées et les ionocytes) (40), en équilibre avec l'absorption sodique menée par le canal ENaC. Ce balancement permet de maintenir un gradient osmotique adéquat afin de conserver un volume de PCL propice au battement ciliaire (Figure 6) (9).

De par cette opposition entre les mouvements sécrétoires et réabsorbants, la fonction de CFTR est donc essentielle au contrôle du volume du PCL : en entraînant l'hydratation de cette couche, CFTR maintient un volume adéquat à la fonction ciliaire pour la clairance mucociliaire (CMC) (9). CFTR est également essentiel au maintien d'autres fonctions physiologiques dans le poumon,

telles que l'activité antimicrobienne, de par la sécrétion d'ions  $\text{HCO}_3^-$  qui contrôlent l'acidité du liquide de surface des VA (ASL; pH d'environ 7,1), et la réparation épithéliale (9,41,42), comme détaillé dans la section 1.1.4.3.5.



**Figure 6. – Échanges ioniques transépithéliaux dans les cellules des VA, responsables des mouvements liquidiens**

Représentation des transports transépithéliaux d'ions régulant l'absorption et la sécrétion ionique et liquidienne ( $\text{H}_2\text{O}$ ) dans les voies aériennes, médiées en partie par les protéines ENaC,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, NKCC1,  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ , CFTR, et les AQP. Inspirée de Hanssens *et al.*, 2021, et créée avec BioRender.com.

### 1.1.4 Fonctions de l'épithélium des voies aériennes

L'épithélium des VA est central à la défense des poumons contre les agressions extérieures. Il représente l'interface entre le milieu interne et l'environnement externe, en agissant en tant que barrière physique contre les nombreuses particules inspirées qui se déposent dans les VA, mais également grâce à la mise en place de la CMC, la réponse inflammatoire et la sécrétion de molécules antimicrobiennes. Sa physiologie repose sur le maintien de plusieurs fonctions pulmonaires essentielles, tant au niveau de la défense des VA, que de leur intégrité pour une santé respiratoire optimale.

#### 1.1.4.1 Clairance mucociliaire

La CMC représente la première ligne de défense contre les pathogènes qui s'accumulent dans les VA (43). Comme introduit précédemment, cette fonction est accomplie grâce aux différents transports ioniques réalisés au niveau des cellules épithéliales des VA. Le potentiel membranaire maintenu par le transport potassique assure l'équilibre entre sécrétion de  $\text{Cl}^-$  et réabsorption de  $\text{Na}^+$ , permettant le transport des fluides au niveau des VA afin de conserver le volume adéquat de PCL, nécessaire à la CMC (9,11).

L'accomplissement de la CMC réside dans la composition de l'ASL, constitué d'une couche de mucus et du PCL sous-jacent. La fine couche supérieure de mucus est composée de plusieurs mucines, les principales présentes étant MUC5AC et MUC5B, qui forment un gel afin de piéger dans le mucus toute particule étrangère inspirée (9,43). Cette couche est également constituée d'eau et de différentes autres protéines. La forte composition en eau agit comme tampon pour le PCL, afin que ce dernier maintienne son volume lors des variations d'hydratation des VA (44). Quant aux autres protéines présentes dans la couche de mucus, telles que les lysozymes, lactoferrines, défensines, lactoperoxydases, elles lui attribuent des propriétés antioxydantes, antiprotéases et antimicrobiennes, permettant de neutraliser les pathogènes emprisonnés dans le mucus (45). Cette couche de mucus est alors évacuée grâce au mouvement ciliaire, possible grâce au PCL (9).

La couche de PCL est constituée à 96% d'eau (et 4% d'ions, lipides, protéines et mucus) et est responsable de la lubrification de la surface des VA et de la fonction ciliaire. De par son contact direct avec les cellules ciliées et sa hauteur similaire à celle des cils (environ 7  $\mu\text{m}$ ), le PCL sépare la couche de mucus de l'épithélium cilié, permettant un environnement favorable au battement coordonné des cils, selon un rythme métachronal (43,46). Ce mouvement assure la remontée du mucus vers les voies supérieures (pharynx, bouche) afin qu'il soit évacué (9).

Il a été proposé que le PCL serait constitué de nombreuses mucines et glycoprotéines attachées aux cils et à la surface épithéliale, formant un filet qui empêcherait les mucines de la couche du mucus, ainsi que les particules piégées dans celui-ci, d'entrer dans le PCL (47). Cette théorie

expliquerait comment la couche de mucus et le PCL co-existent à une telle proximité, sans pour autant se mélanger (44).

#### 1.1.4.2 Réponse inflammatoire

La CMC ne suffisant pas entièrement à la défense de l'épithélium des VA, ce dernier combat également les agents pathogènes inspirés grâce à ses fonctions immunitaires : en présence de microorganismes, les cellules épithéliales déclenchent une réponse inflammatoire afin de neutraliser leur virulence (48).

La reconnaissance des agents pathogènes est réalisée grâce aux récepteurs de reconnaissance de formes (PRR), exprimés en partie par les macrophages circulants dans l'ASL, qui identifient les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) et associées aux dégâts (DAMP), des structures conservées dans les espèces microbiennes. Les PRR sont transmembranaires, comme les récepteurs de type Toll (TLR) et de lectine de type C (CLR), ainsi que cytoplasmiques, tels que les récepteurs de type NOD (NLR) et de type RIG-I (RLR) (49).

Cette reconnaissance, majoritairement réalisée par les macrophages, régule à la hausse la transcription de gènes codant pour des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires, comme IL-1, IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$  (facteur de nécrose tumorale), libérées par l'épithélium des VA et qui activent la réponse inflammatoire en recrutant les cellules immunitaires (49,50). Cette activation résulte en un recrutement des neutrophiles et des monocytes, et une amplification de l'activité des macrophages, afin de neutraliser les agents pathogènes par phagocytose et préserver l'intégrité de l'épithélium pulmonaire (51). Cependant, l'activité des neutrophiles peut également être nocive à cette intégrité épithéliale, par exemple au travers de la sécrétion d'élastase neutrophilique. En effet, bien que cette activité enzymatique joue un rôle clé dans l'élimination des agents pathogènes présents dans les VA, elle contribue entre autres à la progression de la FK, en accentuant l'inflammation et en altérant la CMC et la réparation épithéliale (52).

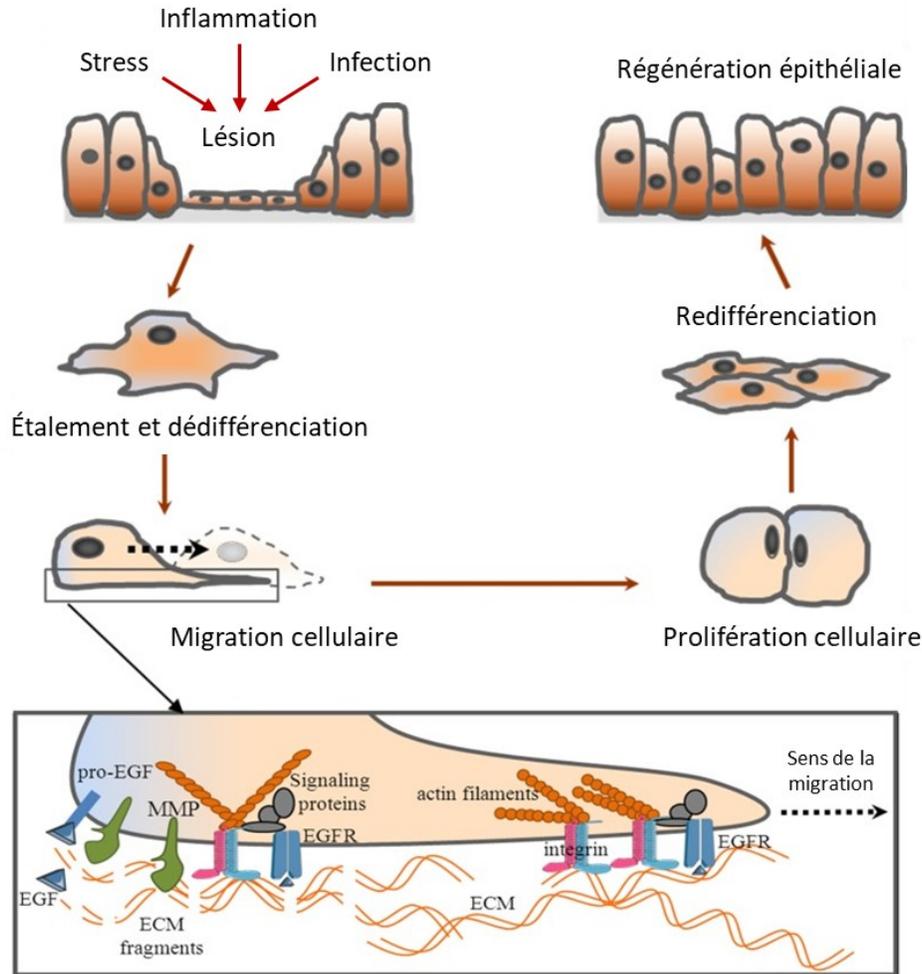
#### 1.1.4.3 Réparation de l'épithélium

L'exposition des VA aux agents pathogènes, à une réponse inflammatoire prononcée ou une autre source d'insulte tissulaire, peut mener à des lésions de l'épithélium. Afin d'assurer l'intégrité

fonctionnelle de la barrière épithéliale, la mise en œuvre de divers mécanismes de réparation et de régénération est requise.

La réparation de la lésion épithéliale repose sur l'intégration de processus complexes, à commencer par l'étalement et la dédifférenciation des cellules progénitrices, qui vont ensuite migrer vers la région épithéliale lésée et y proliférer afin de la repeupler. Elles vont finalement se redifférencier en cellules épithéliales spécifiques des VA (cellules ciliées, sécrétrices), afin de régénérer un épithélium pseudostratifié et fonctionnel (Figure 7) (17). L'accomplissement de ces mécanismes dépend de nombreux changements cellulaires dépendants de la modulation de protéines du cytosquelette, de protéines transmembranaires (telles que les intégrines et les récepteurs de facteurs de croissance) et de voies de signalisations intracellulaires (comme les MAPK). Ces mécanismes sont également régulés par de nombreux facteurs de croissance, des médiateurs inflammatoires (chimiokines et cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires) et des composantes de la matrice extracellulaire (MEC), sécrétés par les cellules épithéliales et endothéliales, les fibroblastes, les macrophages et par la MEC, en réponse à la lésion épithéliale (53).

Parmi les différentes étapes de la réparation, la migration cellulaire représente un processus clé à la restauration de l'intégrité de l'épithélium. La cellule en migration interagit avec la MEC en impliquant la formation de protrusions à l'avant de la cellule, leur adhérence au substrat, le déplacement de la cellule en direction de la lésion, puis le détachement et la rétraction arrière de la cellule (54,55). Ce mouvement directionnel consiste en une répétition cyclique de changements structurels de la cellule : la polymérisation de l'actine à son avant, qui s'aplatit pour former les lamellipodes, et le détachement des sites d'adhésion focaux à son arrière, pour permettre sa rétraction (Figure 7) (17,56). Ce déplacement est possible grâce à la polarisation continue de la cellule migratoire le long de la MEC, orchestrée par une variété de protéines extracellulaires, comme les composants de la MEC et les facteurs de croissance, et cellulaires, comme les protéines du cytosquelette, les intégrines, les métalloprotéinases (MMP) et les canaux ioniques (55,57).



**Figure 7. – Processus de réparation après lésion épithéliale**

Succession des différentes étapes de réparation épithéliale à la suite d’une lésion épithéliale, dont la migration cellulaire qui fait, entre autres, entrer en jeu l’actine, la MEC (ECM, ECM fragments), les intégrines, les MMP, les facteurs de croissance (pro-EGF, EGF, EGFR) et des protéines de signalisation. Adaptée de Girault et Brochiero, 2014.

#### *1.1.4.3.1 Protéines cytosquelettiques*

Les mécanismes cytosquelettiques impliqués dans la migration cellulaire comprennent la fonction des filaments d’actine. Ils forment une maille dans le lamellipode à l’avant migratoire de la cellule, conduisant la protrusion en direction de la lésion. La fonction des protéines du cytosquelette est régulée par un gradient intracellulaire d’ions  $\text{Ca}^{2+}$  (calcium), cette concentration calcique étant plus élevée à l’arrière de la cellule, promouvant sa rétraction, qu’à son avant, favorisant la protrusion du lamellipode (55).

#### *1.1.4.3.2 Matrice extracellulaire et intégrines*

La migration des cellules épithéliales des VA implique leur adhérence transitoire à la matrice provisoire, composée de fibronectine et vitronectine (glycoprotéines), ainsi que de laminine et collagène de type IV (composants de la membrane basale) (54). Leur ancrage dépend alors d'interactions entre leur cytosquelette et les composants de la matrice, par l'intermédiaire de récepteurs basolatéraux, les intégrines (57–59). Cette famille de protéines transmembranaires comprend l'hétérodimérisation de 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$ , formant un total de 24 intégrines distinctives dont l'affinité spécifique dépend de leur assemblage (54). Lorsqu'activées par un signal extracellulaire comme la liaison de facteurs de croissance à leur récepteur, les intégrines à proximité assurent l'adhérence de la cellule à la MEC à partir de la formation de points focaux (60). Cette fonction dépend de cascades de signalisation intracellulaires qui régulent non seulement l'adhérence, mais également la migration et la prolifération cellulaire (59). Les intégrines interagissent également avec d'autres protéines membranaires, telles que les canaux potassiques. Ces interactions sont physiques, via un contact direct entre les deux protéines pour former un couplage conformationnel, et fonctionnelles, l'activation des intégrines semblant réguler les courants potassiques via signalisation calcique, phosphorylation ou protéines G (17).

#### *1.1.4.3.3 Métalloprotéinases*

La traction cellulaire le long de la MEC implique le relâchement des points d'adhésion de la cellule, un processus favorisé par les MMP, surexprimées en contexte de réparation épithéliale (17). Elles facilitent la migration cellulaire en régulant l'adhérence cellulaire, en dégradant les tissus résiduels de la MEC et en remodelant la matrice nouvellement synthétisée (57,58). Les MMP se distinguent selon leur rôle respectif, comme la matrilysine (MMP-7), exprimée constitutivement dans les cellules épithéliales des VA. Cette dernière joue un rôle crucial dans la migration cellulaire en clivant l'ectodomaine de la cadhérine E, permettant en partie la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) indispensable à la réparation épithéliale (57,58). Les MMP participent également au relâchement de facteurs de croissance de par le clivage des pro-facteurs de croissance. Les facteurs de croissance relâchés vont finalement se lier à leurs récepteurs, constituant ainsi un boucle autocrine ou paracrine de signalisation cellulaire (17).

#### *1.1.4.3.4 Facteurs de croissance*

En contexte lésionnel, les facteurs de croissance sont relâchés au site de l'insulte tissulaire afin de contribuer à la réparation épithéliale de par leur modulation de la migration et de la prolifération cellulaire. Par exemple, TGF- $\beta$  (facteur de croissance transformant bêta) contribue à la TEM, et l'HGF (facteur de croissance des hépatocytes) active la synthèse de protéines de la MEC (53). L'EGF (facteur de croissance épidermique) joue un rôle plus central dans la réparation : il stimule globalement la migration cellulaire (tout comme HGF et KGF, facteur de croissance des kératinocytes) et la prolifération et différenciation cellulaire (ainsi que PDGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes) (57). En effet, les travaux du laboratoire ont démontré l'existence d'une boucle autocrine entre EGF et EGFR à partir de cultures primaires de cellules alvéolaires et de lignées de cellules bronchiques, illustrant sa contribution dans le contrôle de la réparation épithéliale (28,29). L'EGF contribue également à la réparation en stimulant l'activité des canaux potassiques comme KvLQT1 (28).

#### *1.1.4.3.5 Canaux ioniques*

Les transports ioniques semblent jouer un rôle majeur dans la réparation épithéliale, en contribuant à la migration, mais également à la prolifération et la différenciation cellulaire (17,30,41,42). Le processus clé de la migration cellulaire serait, d'après un modèle proposé par l'équipe de Dr Schwab, en partie médié par régulation du volume cellulaire, grâce à des protéines de transport ionique (55). L'activité parallèle des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  et du co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  à l'avant de la cellule mènerait à un influx d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ , et donc d'eau par osmose, contribuant à l'extension du lamellipode. Ce mouvement activerait des canaux calciques sensibles à l'étirement et causerait un influx d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , associé à un efflux parallèle d'ions  $\text{K}^+$ , qui induirait la rétraction de l'arrière de la cellule (55). D'après plusieurs laboratoires, dont le nôtre, la prolifération et la différenciation, en plus de la migration cellulaire, semblent aussi être régulées par l'action de protéines de transport ionique, telles que les canaux potassiques (17,29,56) et chloriques (41,42,56,61–64) qui contribueraient plus vastement à la réparation épithéliale.

L'action des canaux potassiques ne s'arrête pas au contrôle du potentiel membranaire pour les mouvements ioniques et liquidiens, ils jouent également plusieurs rôles dans la migration et la prolifération des cellules épithéliales (17). Notre équipe a précédemment démontré que les canaux KvLQT1,  $K_{ATP}$  et KCa3.1 régulent la migration des cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires, en partie grâce à la modulation de la signalisation des facteurs de croissance à laquelle les canaux potassiques participent (28,29). Ces derniers contribuent également à la migration cellulaire en favorisant l'influx calcique intracellulaire, ce qui stimule la transcription génique et active plusieurs protéines participant à la machinerie migratoire, comme la myosine II, les calpaïnes, les calcineurines, les protéines kinases dépendantes de calmoduline et  $Ca^{2+}$ , les intégrines, ainsi que de nombreuses protéines de transports ioniques (56). L'activité des intégrines est modulée par les canaux potassiques, également au travers des interactions physiques et fonctionnelles entre ceux-ci (17). Comme vu précédemment, le rôle essentiel des canaux potassiques dans la migration réside également dans la régulation du volume cellulaire, grâce au gradient osmotique et aux variations de pH qu'ils engendrent, ainsi que dans l'adhérence cellulaire par leur modulation de l'activité des intégrines (17,56). L'importance des canaux potassiques dans la prolifération cellulaire a également été investiguée, en partie par notre laboratoire. Il a été proposé que le contrôle du potentiel membranaire et de l'expression des cyclines par les canaux potassiques régulerait les cycles cellulaires, aidant à la prolifération. En outre, le canal KvLQT1 semble réguler la croissance cellulaire en contrôlant la progression des cycles cellulaires des phases G0/G1 à S, comme en témoigne son inhibition qui entraîne une diminution du nombre de cellules en phases S et G2/M (30). La signalisation de facteurs de croissance à laquelle contribuent les canaux potassiques stimulerait également cette étape de la réparation épithéliale (17). Notre équipe a effectivement démontré que l'activité de canaux potassiques spécifiques contribuait à la prolifération des cellules épithéliales alvéolaires stimulée avec EGF (KvLQT1 et  $K_{ATP}$ ), et des cellules bronchiques (KvLQT1,  $K_{ATP}$  et KCa3.1) (28,29).

Les canaux chloriques jouent également un rôle prépondérant dans la réparation épithéliale des VA. La fonction d'ANO1, un canal chlorique  $Ca^{2+}$ -dépendant (CaCC), a précédemment été démontrée dans ce processus, où son activité régule la migration et la prolifération de cellules épithéliales bronchiques, comme en témoigne son inhibition qui diminue ces deux étapes (61).

Le canal CFTR contribue également à la réparation épithéliale dans les VA, et ce, de plusieurs manières. Le transport chlorique assuré par ce canal participe à la migration cellulaire de par la régulation du volume de la cellule, à son avant comme à son arrière. En effet, l'influx d'ions  $\text{Cl}^-$  aide à l'augmentation du volume de la cellule en son avant, et facilite la rétraction à l'arrière : la régulation précédemment discutée du volume cellulaire par les canaux potassiques à son arrière nécessite l'activité des canaux chloriques afin de maintenir les forces électrochimiques et osmotiques de la cellule (42). CFTR aide aussi à la migration cellulaire à travers l'adhérence à la MEC. Par l'intermédiaire de sa sécrétion d'ions  $\text{HCO}_3^-$ , ce canal régule le pH extracellulaire et crée un gradient qui est acide à l'avant du lamellipode, ce qui promeut la formation de fortes adhésions, et basique à l'arrière, favorisant la désadhésion de la cellule. L'implication des variations du pH par CFTR est également intracellulaire, avec le transport d'ions  $\text{HCO}_3^-$  en dehors de la cellule qui permet de maintenir l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  sensible à l'acidité, acteur dans la polarisation migratoire et la formation du lamellipode (42). Cette protrusion est centrale dans la migration cellulaire, et nécessite l'activité de CFTR pour sa modulation, sans quoi elle est diminuée. Également, l'effet de l'inhibition de CFTR sur la migration cellulaire se constate au niveau de la vitesse de migration, et plus globalement sur la vitesse de réparation des lésions épithéliales, qui sont toutes deux fortement diminuées en contexte d'inhibition du canal. Son activité de sécrétion chlorique est donc essentielle afin de maintenir une migration cellulaire optimale et d'obtenir une réparation lésionnelle et la régénération d'un épithélium fonctionnel (41,42).

Cette action centrale de CFTR se comprend aussi à travers le courant ionique polarisant que le canal forme lors d'une lésion épithéliale, comme démontré dans des cellules de trachée de singe où le champ électrique créé par CFTR favorise une migration cellulaire directionnelle vers la région lésée (62). Plus encore, ce rôle essentiel que joue CFTR dans la réparation épithéliale est constaté dans plusieurs autres modèles épithéliaux, dont des cultures primaires de cellules des VA en FK. La baisse de fonction de CFTR, par silençage ou inhibition pharmacologique de la protéine, mène en effet à une altération de la réparation épithéliale, de par la diminution de son interaction avec le cytosquelette, de la fermeture lésionnelle, de la protrusion du lamellipode ou de la signalisation et l'activation des intégrines (42,65–70).

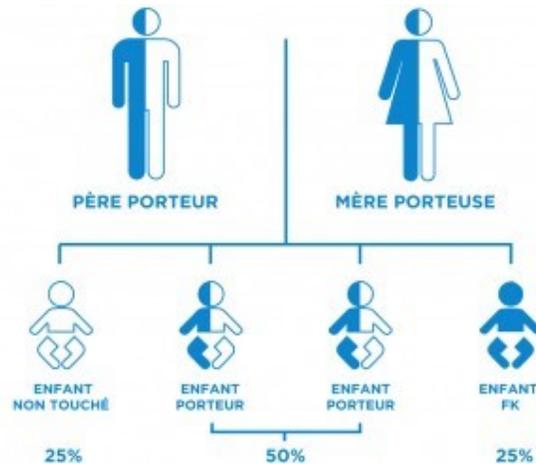
L'activité de concert de ces canaux ioniques aide ainsi à la réparation épithéliale, de par les différents processus qu'ils modulent. La fonctionnalité de l'épithélium des VA est donc grandement affectée lorsque l'activité de ces acteurs centraux de l'intégrité épithéliale est altérée, ce qui arrive malheureusement dans le cas de la FK.

## 1.2 La fibrose kystique

La FK est une maladie génétique autosomale récessive qui touche plus de 100 000 personnes dans le monde (71). Tout groupe ethnique peut être affecté par la maladie, mais elle est beaucoup plus commune dans les populations caucasiennes (72). Au Canada, ce sont plus de 4300 personnes qui sont atteintes de la FK, soit environ 1 naissance sur 3850 (72). Cette incidence est d'autant plus marquée au Québec, où on dénombre en moyenne 1 naissance FK sur 2500 (73,74). Bien qu'aucun traitement curatif n'existe à ce jour pour soigner la maladie, les améliorations des soins et traitements au cours des dernières décennies ont permis de continuellement accroître l'espérance de vie des patients. Si les patients ne dépassaient pas l'âge de 1 an en 1938, lorsque la FK a été décrite pour la première fois par Dorothy H. Anderson (75), l'âge médian de survie est présentement estimé à 57-58 ans (72). Cette plus grande espérance de vie mène cependant à une caractérisation graduellement plus mature de la maladie, ce qui s'associe au développement de nouvelles comorbidités et défis liés à l'âge (76).

### 1.2.1 Étiologie

La FK est causée par des mutations du gène *CFTR* qui code pour le canal chlorique CFTR. L'intégrité de ce gène est requise afin de produire la protéine CFTR de façon intacte et fonctionnelle à la membrane des cellules (77). Cette maladie génétique est hérédité à la naissance par transmission autosomique récessive (71), signifiant que les deux parents doivent être porteurs d'un allèle muté du gène *CFTR* et le transmettre à leur enfant pour qu'il soit atteint de la maladie. Dans un cas de figure où deux parents sont porteurs sains pour la mutation, leur enfant a 50% de chances de l'être également, 25% de chances de n'être pas porteur de la mutation, ou au contraire, 25% d'être atteint de la FK lorsque la mutation est présente sur les deux copies, paternelle et maternelle, du gène (Figure 8).



**Figure 8. – Mode de transmission de la FK (78)**

Depuis la découverte du gène *CFTR* responsable de la FK en 1989 (79), plus de 2100 mutations ont été identifiées à ce jour pour celui-ci (80), catégorisées selon 6 grandes classes (I à VI) selon le défaut de *CFTR* qu’elles engendrent (Figure 9) (81). Les mutations sont également sous-classifiées selon leur sévérité quant à la fonctionnalité de la protéine *CFTR* produite. Celles des classes I à III sont considérées de fonction minimale, et associées à des phénotypes plus sévères pour la maladie, tandis que les mutations des classes IV à VI présentent une fonction résiduelle (fonction ou production réduite de *CFTR*) et des phénotypes moins sévères associés à la maladie (82–84). La sévérité de la FK n’est cependant pas entièrement corrélée aux mutations du gène *CFTR*, des facteurs environnementaux et génétiques rentrent également en cause dans le phénotype développé pour chaque patient FK (85).

#### 1.2.1.1 Classe I

Les mutations de cette classe mènent à l’absence de production de protéine *CFTR* fonctionnelle. Elles comprennent majoritairement des mutations de type non-sens qui génèrent des codons de terminaison prématurés (PTC), ainsi que les mutations d’épissage canonique et de délétion chromosomique, résultant ultimement à la production d’acide ribonucléique (ARN) tronqué instable (82). Pour cette classe, la mutation la plus commune à l’échelle mondiale est la G542X, affectant au moins un allèle d’environ 4% de la population FK (86). Au Canada, la plus prévalente est la 621+1G>T, touchant 6,1% de sa population, suivie des mutations G542X et 711+1G>T (72).

#### 1.2.1.2 Classe II

Ces mutations sont associées à un défaut de maturation de la protéine CFTR, généralement dû à un repliement défectueux de la protéine lors de son assemblage dans le RE. Cette protéine défectueuse ne passant pas le contrôle qualité du RE, celui-ci va alors retenir la protéine, la « rétro-transloquer » vers le cytoplasme où elle sera dégradée par le protéasome, résultant en une quasi-absence de protéines CFTR à la membrane cellulaire (81,86).

La mutation la plus commune pour cette classe est la F508del, qui consiste en la délétion de trois paires de bases, entraînant la perte de l'acide aminé phénylalanine en position 508, responsable d'un défaut de repliement de la protéine et de son instabilité subséquente qui mène à sa dégradation. La protéine présente également d'autres défauts, comme des problèmes d'ouverture du canal ou de stabilité lorsqu'elle se rend à la membrane cellulaire, caractéristiques des mutations de classe III et VI (81,87). F508del est la mutation la plus prévalente à l'échelle mondiale, et également au Canada, où 86% des patients FK en sont porteurs. Plus particulièrement, 45,7% des patients FK sont homozygotes pour la F508del (porteurs des deux copies de la mutation) et 41,1% sont hétérozygotes pour la mutation (72).

#### 1.2.1.3 Classe III

Les mutations de classe III engendrent un défaut de régulation de la protéine. Celle-ci arrive bien à la membrane cellulaire mais présente une activation défectueuse, empêchant l'ouverture du canal chlorique (81,83). Ces mutations sont généralement localisées dans les sites de liaison de l'ATP des NBD1 et NBD2 de CFTR et vont mener à la production d'une protéine CFTR qui sera insérée à la membrane cellulaire, mais présentant un défaut d'activation par la PKA, diminuant donc l'ouverture du canal par changement de conformation. La mutation G551D est la plus commune pour cette classe (86).

#### 1.2.1.4 Classe IV

Cette classe regroupe les mutations causant un défaut de conduction de la protéine CFTR, résultant en une diminution du courant chlorique. Elles vont altérer les STM impliqués dans la formation du pore du canal chlorique à la membrane cellulaire, et ainsi entraîner une diminution

de sa conductance (probabilité d'ouverture et perméabilité au Cl<sup>-</sup>) (83,86). La protéine CFTR produite reste cependant partiellement fonctionnelle (mutation qualifiée avec fonction résiduelle, comme pour les classes V et VI de mutations suivantes).

### 1.2.1.5 Classe V

Les mutations de cette classe mènent à une quantité réduite de protéine CFTR produite à la membrane cellulaire. Elles affectent généralement l'épissage de l'ARN pré-messager, ce qui induit l'exclusion partielle ou complète d'un exon et réduit ultimement la production optimale de protéines CFTR (83,86).

### 1.2.1.6 Classe VI

Les mutations de classe VI sont plus rares. Ces mutations, généralement dans l'extrémité C-terminale, sont causées par un décalage dans le cadre de lecture ou des PTC. Elles entraînent une instabilité de la protéine CFTR mature produite, et ainsi, une instabilité du canal à la membrane cellulaire (82,87).

Normal	I	II	III	IV	V	VI
CFTR defect	No functional CFTR protein	CFTR trafficking defect	Defective channel regulation	Decreased channel conductance	Reduced synthesis of CFTR	Decreased CFTR stability
Type of mutations	Nonsense; frameshift; canonical splice	Missense; aminoacid deletion	Missense; aminoacid change	Missense; aminoacid change	Splicing defect; missense	Missense; aminoacid change
Specific mutation examples <sup>11</sup>	Gly542X Trp1282X Arg553X 621+1G→T	Phe508del Asn1303Lys Ile507del Arg560Thr	Gly551Asp Gly178Arg Gly551Ser Ser549Asn	Arg117His Arg347Pro Arg117Cys Arg334Trp	3849+10kbC→T 2789+5G→A 3120+1G→A 5T	4326delTC Gln1412X 4279insA

Figure 9. – Classification des mutations de CFTR (82)

La conséquence des mutations de CFTR en FK se distingue au niveau physiologique, de par la sécrétion chlorique altérée, ce qui entraîne un déséquilibre ionique et hydrique et mène ultimement à de multiples symptômes.

### **1.2.2 Diagnostic et dépistage**

Depuis la première description de la FK en 1938 (75), la maladie a longtemps été diagnostiquée par les professionnels de la santé à partir des symptômes visibles qui y sont associés (88). Ce diagnostic était généralement posé en bas âge, compte tenu de la courte espérance de vie liée à la maladie à cette époque, mais la FK était également diagnostiquée chez certains adultes lorsque sa sévérité était moindre (89). Étant donné le phénotype souvent moins sévère lié aux mutations de fonction résiduelle (classes IV, V et VI), des individus FK pouvaient effectivement être diagnostiqués tardivement pour la maladie, les privant d'interventions précoces permettant d'améliorer leur pronostic au long terme (90). En outre, une absence de corrélation génotype-phénotype est aussi possible, lorsque des patients FK à mutations de fonction minimale (classes I, II et III) présentent un phénotype moins sévère qu'en général pour ces mutations.

Si l'insuffisance pancréatique (IP) et la perte de fonction pulmonaire étaient auparavant considérées comme des références dans le diagnostic de la FK, il n'est pas rare que des individus souffrant de la FK soient asymptomatiques (91). Ainsi, il a plus tard été reconnu qu'une anomalie des électrolytes dans la sueur représentait une caractéristique davantage fiable à l'identification de la maladie, étant présente dans 95% des cas FK (89,92), malgré la possibilité de faux positifs (93). C'est selon cette caractéristique, retrouvée dans le goût salé de la peau d'un individu FK (94), que le test de sudation a premièrement été développé, actuellement un standard dans le diagnostic de la maladie (92). Le test de sudation repose sur l'évaluation de la fonction de la protéine CFTR dans les glandes sudoripares à la surface de la peau, à partir de la mesure de concentration de chlorure dans la sueur produite. Afin d'être collectée, la transpiration est induite par l'ionophorèse de la pilocarpine, un processus visant à stimuler les glandes sudoripares par l'application d'un faible courant et d'une solution de pilocarpine imbibée sur une gaze. Selon la concentration de chlorure mesurée, le diagnostic pour la FK est rejeté ( $\leq 29$  mmol/L), inconcluant (30-59 mmol/L), ou posé ( $\geq 60$  mmol/L) (92).

La généralisation du dépistage néonatal ces dernières décennies dans les pays développés, ainsi que l'identification du gène *CFTR* en 1989, a rendu ce test de dépistage maintenant standard chez les nouveau-nés, permettant un accès immédiat et spécialisé à des interventions précoces pour les individus souffrant de la FK (88,95) et une amélioration subséquente de leur qualité de vie et chances de survie (96). Le dépistage néonatal, dernièrement approuvé au Québec depuis 2018, a mené au diagnostic de la maladie chez 73% des individus FK avant l'âge de 2 ans dans cette région (72). Ce test consiste à réaliser un prélèvement sanguin au 3<sup>e</sup> jour du nouveau-né et mesurer le taux de trypsine immunoréactive (TIR) contenu dans le sang (95). De hautes valeurs témoignent de l'atteinte du pancréas, de par les sécrétions épaisses liées à la FK qui obstruent les canaux pancréatiques et mènent à une accumulation de la TIR dans le sang (77), et ce résultat positif est alors vérifié de nouveau avec une seconde mesure au 20<sup>e</sup> jour du nouveau-né (95).

Le dépistage néonatal ne suffisant pas afin de poser un diagnostic de la FK, et parce qu'il peut être faussement positif, créant ainsi un stress inutile pour les familles (91,97), un test de sudation est généralement réalisé par la suite afin de le vérifier. Outre le dépistage néonatal, ce test est également réalisé lorsqu'il y a un historique familial de FK ou la présence de symptômes associés à la maladie (98).

À la suite du test de sudation, des analyses génétiques sont réalisées afin de vérifier l'absence de mutations de *CFTR* si le test n'était pas concluant, ou de confirmer la présence de mutations de *CFTR* dans le cas inverse, ainsi que de permettre leur identification, essentielle à l'éligibilité du patient aux traitements spécifiques. Un génotypage inconcluant d'un individu soupçonné d'être atteint de la FK devrait être suivi de tests physiologiques, comme les mesures de NPD (« nasal potential difference ») et ICM (« intestinal current measurement »), dans le but de tester la fonctionnalité de *CFTR* respectivement au niveau nasal et intestinal (98,99).

Lorsqu'un diagnostic pour la FK est finalement confirmé pour un individu, le professionnel de la santé en charge le redirige alors, ainsi que sa famille ou responsables légaux, vers une clinique FK afin de pouvoir commencer toute intervention liée à sa condition et prévenir au mieux l'atteinte de ses organes liée à la FK (91).

### 1.2.3 Manifestations multisystémiques et aspects cliniques

La conséquence dégénérative progressive de la FK est multisystémique. La dysfonction dans les mouvements ioniques et hydriques transépithéliaux, causée par la FK, mène effectivement à des sécrétions de mucus épaisses et visqueuses. Son accumulation affecte principalement l'appareil respiratoire et digestif, mais également d'autres organes, menant à d'autres mauvaises conditions pour la santé, contribuant davantage à la morbidité associée à la maladie (100–103).

Les symptômes gastro-intestinaux (GI) et pancréatiques (pour les mutations plus sévères de la FK) sont les premières manifestations liées à la FK qui apparaissent chez un individu souffrant de la maladie (104,105), et compte tenu de l'amélioration croissante de l'espérance de vie associée à celle-ci, leur prévalence croît également de façon continue dans la population FK vieillissante, de même que le développement de diabète et complications hépatiques (106–109). L'IP est caractéristique de la FK, associée à une malabsorption des nutriments, une croissance altérée et des manifestations hépatobiliaires (104). Ce symptôme a été la première manifestation identifiée pour la FK (75) et reste encore à ce jour un aspect clé et commun à l'identification de la maladie chez les individus porteurs de mutations sévères de classes I, II et III (106). Cette atteinte, présente dans 85% de la population FK (72,100), consiste en une baisse de la production des enzymes du suc digestif par perte de la fonction pancréatique, due au défaut de CFTR qui épaissit ultimement le mucus et obstrue les canaux pancréatiques. Cette IP crée alors un besoin de suivre une supplémentation en enzymes pancréatiques afin d'aider à digérer les aliments et absorber les nutriments, une thérapie commune chez les individus FK (110).

L'accumulation de sécrétions visqueuses en raison de la protéine CFTR mutée dans les cellules épithéliales mène à d'autres symptômes hépatobiliaires graves, comme la fibrose et la cirrhose hépatique ou les sténoses et calculs biliaires, des manifestations représentant la 3<sup>e</sup> cause de décès en FK (111). D'autres symptômes GI au niveau luminal sont aussi communs, comme le reflux gastro-œsophagien, l'altération de la motilité GI, l'iléus méconial, la constipation, le syndrome d'occlusion distale de l'intestin, les cancers digestifs, des douleurs abdominales et le syndrome de l'intestin irritable (107).

La FK mène également au développement de diabète, une complication majeure de la maladie (112) qui est surtout commune à l'âge adulte et est associée à une perte pondérale et un déclin plus rapide de la fonction pulmonaire (72). Des problèmes de densité osseuse sont également courants, menant à de l'ostéoporose et de l'ostéopénie (113). Au niveau du système reproducteur, des complications telles que le retard de puberté et l'infertilité sont également fréquentes dans la population FK, et plus particulièrement l'infertilité masculine qui est présente chez la plupart de ces patients (114–116).

La santé mentale est un autre aspect majeur de la maladie qui n'est souvent pas assez considéré. Les cas d'anxiété et de dépression sont communs chez les adultes, autant chez les patients FK que chez les parents et aidants, affectant environ 30% d'entre eux (72,117). Cette atteinte affecte davantage la dégradation de la santé physique liée à la FK et n'aide pas à l'amélioration de la qualité de vie, même après l'éventuel contrôle de la fonction pulmonaire, un aspect majeur de la maladie (117).

### **1.2.4 Manifestations pulmonaires**

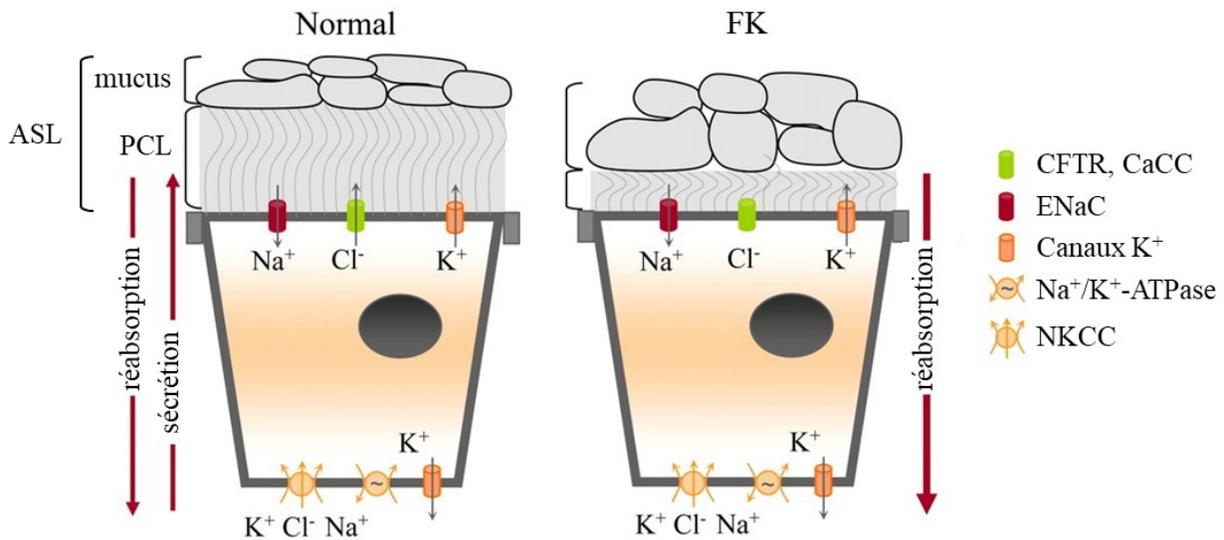
Bien que la FK affecte de nombreux organes, l'atteinte progressive des poumons jusqu'à leur perte de fonction représente la principale cause de morbidité et de mortalité chez les individus souffrant de FK (106). Ce déclin se constate plus concrètement par la mesure du VEMS (volume expiratoire maximal par seconde), correspondant au volume d'air expiré pendant la première seconde d'une expiration forcée. Cette mesure permet d'évaluer et suivre la fonction pulmonaire, et témoigne de la sévérité de la maladie chez les patients FK, au vu de la baisse progressive de la fonction pulmonaire avec l'âge (72).

Au niveau physiologique, le dysfonctionnement de la sécrétion chlorique, causé par la FK, entraîne une diminution du volume de PCL, une acidification de l'ASL, une perte de fonction de la CMC et, en conséquence, l'accumulation d'un mucus épais et visqueux dans les VA. Cette atteinte favorise alors l'installation d'infections bactériennes persistantes et une inflammation chronique dans les VA, altérant ultimement l'intégrité épithéliale des poumons (48,118). Les dommages épithéliaux causés par ces insultes tissulaires mènent éventuellement au déclin de la fonction pulmonaire si la réparation épithéliale des VA n'est pas restaurée.

#### 1.2.4.1 Défaut de clairance mucociliaire

En FK, l'absence ou la perte de fonction du canal CFTR causée par ses mutations, entraîne une diminution de la sécrétion des ions  $\text{HCO}_3^-$ , ce qui acidifie l'ASL en dessous d'un pH de 7,0 et active l'élastase des neutrophiles, affectant l'activité des facteurs antimicrobiens (9,118).

La conséquence majeure de la perte de fonction de CFTR réside cependant dans le déséquilibre entre la sécrétion dysfonctionnelle des ions  $\text{Cl}^-$  et l'absorption des ions  $\text{Na}^+$ , ce qui diminue secondement le mouvement liquidien vers la surface des cellules épithéliales des VA (118). Étant donné l'activité continue d'ENaC qui maintient l'absorption liquidienne, la déshydratation de l'ASL mène à une réduction du volume du PCL, ne s'élevant alors qu'à une hauteur d'environ 4  $\mu\text{m}$ , inférieure à celles des cils de 7  $\mu\text{m}$  (46).



**Figure 10. – Transports impliqués dans les variations de l'ASL en condition saine et FK**

Schématisation des transports ioniques et hydriques et variations du volume de PCL dans les voies aériennes, en condition saine (normal) et en FK. Adaptée de Bardou *et al.*, 2009.

La déshydratation de l'ASL contribue à l'hyperviscosité de la couche supérieure de mucus et la fait collapser sur l'ensemble des cils, restreignant la fonction ciliaire et donc la CMC (Figure 10) (9,43,119). L'élimination du mucus qui s'accumule dans les VA se complexifie alors, et cette obstruction prédispose les poumons à des cycles d'infections bactériennes et d'inflammation chronique (9).

### 1.2.4.2 Infections bactériennes

La FK est caractérisée par des infections bactériennes qui contribuent fortement à la destruction de l'épithélium, et donc au déclin progressif de la fonction respiratoire. Elles sont d'abord aiguës, d'origine environnementale et combattues à l'aide des réponses immunitaires de l'hôte et de traitements antibiotiques. Malgré cela, les infections comme à *Pseudomonas aeruginosa* peuvent devenir intermittentes. Ces réinfections transitionnent éventuellement en infections chroniques, caractérisées par des changements fondamentaux dans les bactéries : à l'aide de leur capacité à s'adapter à leur environnement, comme avec la formation de réservoirs bactériens (biofilms), ces bactéries colonisent les VA et les patients FK souffrent alors de cycles d'infections. Éventuellement, en raison des traitements antibiotiques régulièrement suivis par les patients FK, une résistance antibiotique se développe dans les lignées bactériennes au cours de leur évolution, menant à de fréquentes exacerbations (120,121). La prévalence de ces infections pulmonaires varie selon l'évolution de la maladie des patients, en fonction de leur l'environnement et de leur l'âge. Les infections respiratoires aux bactéries *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), aux champignons *Aspergillus fumigatus*, au complexe *Burkholderia cepacia* (CBC) et autres mycobactéries sont plus ou moins communes, mais deux infections bactériennes se démarquent dans la population FK (Figure 11) (72).

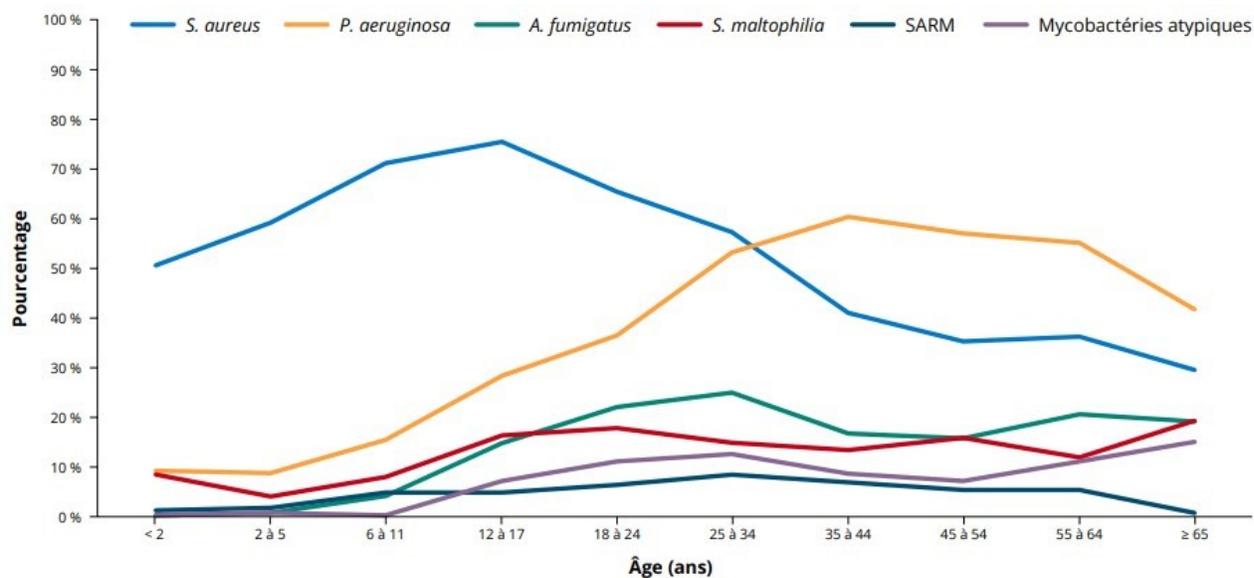


Figure 11. – Prévalence des infections respiratoires selon l'âge (72)

*S. aureus* prédomine à l'enfance, tandis que *P. aeruginosa* devient prépondérant à l'âge adulte, deux infections pour lesquelles les patients FK sont davantage susceptibles que les individus sains et patients non-FK (122). *P. aeruginosa* représente un tournant dans la FK pour les patients, étant très nocif pour la santé pulmonaire et donc considéré comme un mauvais pronostic pour la suite de la maladie. L'infection à *P. aeruginosa* ne remplace cependant pas celle à *S. aureus* au fil du temps (une hypothèse auparavant proposée), mais il est plutôt commun avec l'âge que les patients FK finissent par présenter des co-infections à ces deux bactéries, affectant davantage leur fonction pulmonaire (123–125).

L'atteinte néfaste des bactéries réside principalement dans les VirF qu'elles produisent, qui pénètrent le PCL et entrent en contact avec les cellules épithéliales (126). En outre, la sécrétion dysfonctionnelle des ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$  par CFTR en FK accentue davantage l'atteinte des infections bactériennes dans les VA. Effectivement, le défaut de CFTR entraîne, par diminution des flux ioniques en question, une réduction du volume du PCL, de la CMC, du pH de l'ASL et des défenses antimicrobiennes, ce qui promeut la colonisation, la croissance et la persistance des bactéries dans les VA (9,127,128).

#### 1.2.4.2.1 *Staphylococcus aureus*

La bactérie *S. aureus* est la plus prévalente en bas âge, touchant plus de 50% de la population FK en Amérique du Nord (72,122). Auparavant la principale cause de décès en FK, elle contribue aux premiers dommages épithéliaux chez ces patients. Ce pathogène opportuniste contrôle sa virulence à partir d'un système complexe de régulation et maintient sa colonisation des VA à partir des VirF qu'il sécrète. Ces molécules comprennent des adhésines de surface cellulaire, des enzymes hydrolytiques et des toxines, telles que les cytolysines, dont la production est contrôlée par le système QS (« quorum sensing ») Agr (« accessory gene regulator »). Ce système permet à la bactérie de communiquer avec les autres cellules, d'être sensible à son environnement et, en fonction, de réguler son expression génique, ses VirF et sa formation de biofilms pour ainsi assurer sa persistance dans les VA (129). Ce phénomène contribue alors à l'évolution de *S. aureus*, avec l'émergence de variants comme le SARM et les « small-colony variants » (SCVs). L'amélioration progressive de l'espérance de vie chez les patients FK a mené à une prévalence croissante de

l'infection SARM, une souche démontrant une grande capacité à acquérir une résistance à presque tout antibiotique (130). Concernant les SCVs, ils sont un variant phénotypique sous-type de *S. aureus*, reconnus pour leur aptitude à persister dans les VA. Ces souches mutantes et résistantes aux antibiotiques favorisent alors la chronicité de la bactérie dans les VA et perpétuent davantage les dommages épithéliaux et le déclin de la fonction pulmonaire (131–133).

#### 1.2.4.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Avec l'amélioration croissante de l'espérance de vie en FK, la bactérie *P. aeruginosa* devient prévalente avec l'âge, touchant près de 40% de la population FK au Canada (72). L'infection des VA à ce pathogène opportuniste est associée à une forte morbidité et mortalité en FK, due à son système de virulence (122). La virulence de *P. aeruginosa* est régulée par quatre systèmes QS : Rhl, Pqs, Iqs, et finalement Las, qui régule l'activité de ces trois derniers, en plus de médier la production des protéases et élastases comme LasA et LasB, à partir de la protéine régulatrice LasR du QS. Ces VirF contribuent aux dommages épithéliaux dans les VA, comme la mort cellulaire, la perte de l'intégrité par perte des jonctions cellulaires, et l'altération de la morphologie cellulaire (134–136). Les systèmes QS sont essentiels à la virulence de *P. aeruginosa*, mais également au développement de biofilms.

Au cours du temps, la bactérie *P. aeruginosa* évolue vers une infection chronique, étant à l'origine aigüe, à partir de son adaptabilité intrinsèque pour l'environnement qu'offre le mucus stagnant dans les VA en FK. Cette adaptabilité s'illustre au travers de nombreuses variations génotypiques et phénotypiques (qui en sont consécutives), telles que la perte du flagelle, la baisse de production d'élastase, l'altération de son système QS, et l'augmentation de sa résistance aux antibiotiques et au système immunitaire de l'hôte (128,137–139). En effet, *P. aeruginosa* développe éventuellement des biofilms, un ensemble bactérien formé par une matrice extracellulaire produite par les bactéries (composée d'exopolysaccharides comme l'alginate, d'ADN, de lipides et de protéines) qui les protègent, leur attribuant une meilleure capacité de survie et persistance dans leur environnement (121). Ces biofilms installés à la surface des épithéliums permettent donc de conserver l'infection de la bactérie dans les VA, favorisant sa multiplication, et donc une réponse inflammatoire prononcée.

#### 1.2.4.3 Inflammation chronique

Une autre caractéristique de la FK est la forte inflammation chronique, causée par de nombreux éléments. Le défaut de CFTR mène à une réponse immunitaire dysfonctionnelle et une stimulation immunologique accentuée et persistante (128), causant une accumulation des neutrophiles et macrophages recrutés dans les VA, ainsi que de leurs sécrétions de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), espèces réactives de l'oxygène, ou protéases (élastase neutrophilique) (128). Cette dernière semblerait d'ailleurs avoir pour conséquence de dégrader la protéine CFTR, accentuant davantage la pathologie de la FK (140). Les cellules épithéliales sont également responsables de la production et sécrétion exacerbée de ces cytokines dans les VA, en réponse à une insulte tissulaire comme l'inflammation, ce qui intensifie le contexte inflammatoire (141,142). La dysfonction de CFTR semble également causer une régulation à la hausse de NK- $\kappa$ B, un important facteur de transcription pro-inflammatoire pour la synthèse d'IL-1, IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$  (143). L'accumulation des agents pro-inflammatoires va mener à une altération des jonctions cellulaires et de l'activité des neutrophiles et macrophages, diminuant la phagocytose des agents pathogènes dans les VA (9,51). Ajouté à cela une altération de l'apoptose, de l'efférocytose et de l'activité des agents anti-inflammatoires, la réponse inflammatoire prononcée n'est pas résorbée, tandis que les infections bactériennes persistent. La sécrétion de TNF- $\alpha$ , cette cytokine majeure dans l'inflammation en FK, peut cependant être bénéfique à la réparation épithéliale, de par l'amélioration de la migration cellulaire, comme démontré au laboratoire (144). L'inflammation prononcée des VA amène cependant un stress trop important pour les cellules épithéliales, altère la réparation épithéliale de façon générale et engendre ultimement des dommages épithéliaux dans les VA (51,128,145).

#### 1.2.4.4 Dommages épithéliaux

Les dommages progressifs engendrés par la persistance des infections bactériennes et de l'inflammation chronique dans les VA mènent généralement au développement d'une bronchiectasie, résultant en une perte de la fonction pulmonaire (146). Plusieurs types et origines de dommages épithéliaux sont toutefois documentés. La bactérie *P. aeruginosa*, par exemple, détériore la barrière physique que représente l'épithélium, en altérant les jonctions cellulaires,

et engendre une perméabilité épithéliale qui favorise davantage l'installation des infections pulmonaires dans les VA. En effet, les cellules proches de lésions épithéliales et de membranes basales dénudées sont plus susceptibles d'être liées à *P. aeruginosa* par leurs TLR, altérant par ailleurs les mécanismes intracellulaires de réparation (136). Cette bactérie opportuniste profite de la division cellulaire en cours ou de sites de sénescence cellulaire, associés à des altérations des jonctions cellulaires, pour se faufiler dans l'épithélium et infiltrer les cellules épithéliales au niveau basolatéral, complexifiant davantage leur élimination.

Les infections bactériennes infiltrées dans l'épithélium altèrent subséquemment les processus de réparation épithéliale, comme rapporté dans la littérature (128,136) et démontré dans notre laboratoire (147–150). Les VirF de *P. aeruginosa* affectent par exemple l'expression et la fonction du canal CFTR à la membrane apicale, et ce, de plusieurs façons : par réduction de la synthèse protéique de CFTR, augmentation de sa dégradation, ou inhibition de son recyclage apical (148,149,151). Compte tenu de l'implication du canal CFTR dans les mécanismes de réparation de l'épithélium, comme la prolifération et la migration cellulaire, l'altération de la fonction de CFTR en raison de la présence de ces VirF va atténuer ces processus de réparation épithéliale (147,150,152). L'atteinte liée à *P. aeruginosa* sur la migration cellulaire se constate plus particulièrement à travers ses VirF sécrétés qui inhibent la migration des cellules et augmentent leur tortuosité, affectant le processus de migration, et ultimement la réparation des lésions épithéliales (147,150). Les VirF de la bactérie *S. aureus* altèrent également la réparation épithéliale. Notre équipe a démontré, dans des cultures cellulaires des VA nasales, que les VirF de *S. aureus* altèrent effectivement l'organisation cytosquelettique, la réparation lésionnelle, et réduisent les contacts focaux et les protrusions, nécessaires pour la migration cellulaire (153). Ces VirF exacerbent également l'inflammation en contexte inflammatoire, perturbent la fonction de la barrière épithéliale et la CMC et, au niveau de la cornée, altèrent la réparation épithéliale en contexte lésionnel (152,154,155). Leur conséquence néfaste sur la réparation épithéliale au niveau bronchique requiert cependant d'être investiguée davantage.

Ce phénomène infectieux et inflammatoire crée un cercle vicieux dans la maladie de la FK, où les dommages épithéliaux altèrent davantage les défenses contre les agents pathogènes et la CMC (128). L'accentuation de ces dysfonctions favorise alors de nouveau les infections bactériennes et

l'inflammation chronique des VA, phénomènes non résolus par la CMC toujours dysfonctionnelle en FK, menant inévitablement au déclin de la fonction pulmonaire (136).

Les dommages épithéliaux dans les VA sont également engendrés, de façon plus indirecte, par le défaut de base de CFTR qui affecte la capacité de réparation épithéliale, et donc la régénération d'un épithélium sain et fonctionnel. Nos travaux et la littérature confirment effectivement que ces processus sont altérés dans les VA en FK, dû au dysfonctionnement du canal CFTR muté (41,42,147,156). À partir de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques FK, un défaut de réparation épithéliale est notable, comparativement à la réparation épithéliale de cultures primaires saines, confirmant un défaut de base présent en FK (41,147). Les processus de réparation épithéliale dépendent donc de la fonction de CFTR, qui y contribue au travers de sa fonction dans le transport ionique, la formation de protrusions cellulaires pour la migration, ainsi que son association aux protéines cytosquelettiques, membranaires (intégrines) et de la MEC (41,42,157). Au niveau histologique, les dommages épithéliaux dans des VA FK s'illustrent par un détachement de l'épithélium, la désorganisation des jonctions serrées, la perte de fonction des cellules ciliées et le remodelage tissulaire (41,158,159).

Nos travaux et la littérature démontrent cependant que la correction du défaut de CFTR, à l'aide de traitements tels que les modulateurs de CFTR, permettent d'améliorer les processus de réparation épithéliale, un aspect essentiel du traitement de la FK qui sera discuté par la suite (section 1.2.5.3) (41,147).

## 1.2.5 Traitement de la maladie

Bien qu'aucun traitement curatif n'existe encore pour la FK, les avancées de ces dernières décennies ont permis la mise au point de nombreux traitements. Ils se distinguent dans leur action, aidant à traiter les symptômes de la maladie, ou ciblant le défaut primaire de CFTR dans l'objectif de le corriger.

### 1.2.5.1 Traitements symptomatiques

#### 1.2.5.1.1 Traitements contre les infections bactériennes et l'inflammation

L'amélioration significative de la survie chez les patients FK au fil des décennies est premièrement attribuée au développement de traitements palliatifs symptomatiques, tels que les antibiotiques et anti-inflammatoires (160). L'antibiothérapie permet de prévenir et traiter les infections bactériennes et de ralentir la progression des dommages pulmonaires. Plusieurs antibiotiques spécifiques aux bactéries communes en FK ont été développés, comme la tobramycine, qui inhibe la synthèse protéique bactérienne, ou l'azithromycine, un macrolide inhibiteur QS qui présente des propriétés antibiofilms et anti-inflammatoires, deux antibiothérapies communes orientées contre *P. aeruginosa*, l'infection la plus prévalente en FK (72,137,161). Parce que l'efficacité de l'antibiothérapie vient à être atténuée avec le développement graduel d'une résistance antibiotique (137,138), menant à la persistance des symptômes de la FK, les anti-inflammatoires sont aussi importants afin de contrer l'inflammation chronique due aux infections bactériennes. Les premiers étudiés pour la FK furent les corticostéroïdes qui réduisent la formation du mucus, inhibent l'activité des leucocytes et de NK- $\kappa$ B, et interfèrent avec la synthèse et la fonction des médiateurs inflammatoires. Leur utilisation à long terme semble être associée à un déclin moins rapide de la fonction pulmonaire, mais surtout au développement de complications métaboliques et osseuses, entre autres, qui l'emportent sur les bénéfices observés (160,161). Le seul traitement anti-inflammatoire actuellement recommandé est l'ibuprofène. À fortes doses, ce traitement non stéroïdien a pour effet de diminuer l'infiltration neutrophilique au site de l'inflammation, inhiber l'activité de NK- $\kappa$ B et moduler les voies de signalisation inflammatoires, parmi d'autres fonctions aidant à atténuer l'inflammation chronique. Ultimement, l'ibuprofène améliore la fonction pulmonaire et le poids des patients (161).

#### *1.2.5.1.2 Traitements contre l'obstruction des voies aériennes*

Les traitements antibiotiques et anti-inflammatoires sont souvent couplés à la physiothérapie, un standard dans le traitement physique de la FK, afin de soulager l'obstruction des VA, et donc les symptômes chez les patients. Cette thérapie permet le nettoyage des VA en évacuant le mucus qui y est logé et qui retient les agents pathogènes inspirés. Cette thérapie consiste en plusieurs exercices, comme la pression expiratoire positive (PEP), le drainage postural avec percussions ou les techniques d'expiration forcée (72,100). Les résultats ne sont cependant que de court terme et des stratégies supplémentaires doivent être adoptées.

La restauration de la CMC est l'objectif de nombreuses thérapies développées, telles que des traitements administrés par inhalation, qui représentent un moyen de dégager l'épais mucus stagnant dans les VA. Cette thérapie comprend les bronchodilatateurs qui élargissent les VA pour faciliter la respiration, et les mucolytiques qui liquéfient les sécrétions respiratoires pour leur évacuation (comme la dornase alfa), réduisant ultimement les symptômes respiratoires de la maladie (104,162).

L'hydratation de l'ASL aide à la restauration de la CMC, prévenant conséquemment le cercle vicieux des infections pulmonaires, de l'inflammation et des lésions épithéliales. En plus des traitements par administration d'une solution saline hypertonique ou de mannitol qui engendre un gradient osmotique afin de réhydrater les VA (100,163), d'autres thérapies visant à rétablir l'équilibre ionique entre la sécrétion chlorique et l'absorption sodique, et donc la sécrétion liquidienne, ont ce même objectif. Dans cette optique, il a dernièrement été proposé que la régulation à la hausse des canaux chloriques ANO1 (par les potentiateurs ETX001 et ETD002) et SLC26A9 contribuerait à cet effet, de même que la régulation à la baisse du canal ENaC, grâce à l'inhibiteur BI 1265162 par exemple (164–166).

#### *1.2.5.1.3 Traitements contre la malnutrition*

À cause des problèmes gastro-intestinaux et de l'IP en FK, une atteinte vastement répandue chez les patients (plus de 80% d'entre eux au Canada), ces derniers souffrent d'une malabsorption des nutriments. Ils ont alors besoin de prendre des suppléments en enzymes pancréatiques et en vitamines afin d'aider à la digestion des aliments et à leur croissance. Les thérapies d'enzymes

pancréatiques ont été le premier traitement palliatif développé, dans les années 1950, représentant la première amélioration de survie chez les patients FK (167). Une attention précoce portée à cette malnutrition permet ainsi d'améliorer cette atteinte avec l'âge, les adultes FK souffrant généralement moins d'IP que les enfants, même si la prise des suppléments en question reste nécessaire (72,168,169).

#### 1.2.5.1.4 Transplantation pulmonaire

Lorsque la défaillance respiratoire liée à la FK devient trop sévère, la transplantation pulmonaire est alors envisagée en dernier recours. La FK représente l'indication la plus commune chez les enfants, et la 3<sup>e</sup> chez les adultes, pour la transplantation pulmonaire, bien que cette fréquence diminue rapidement grâce aux récents traitements avec les modulateurs de CFTR. Cette solution temporaire permet de prolonger l'espérance de vie des patients, mais elle a ses limites : 50% des patients transplantés décèdent après 10 ans au Canada (72,170). Cette alternative ne permet également pas d'améliorer l'état et la fonction des autres organes touchés par l'atteinte multisystémique de la FK : il reste toujours à régler le défaut de CFTR à sa source.

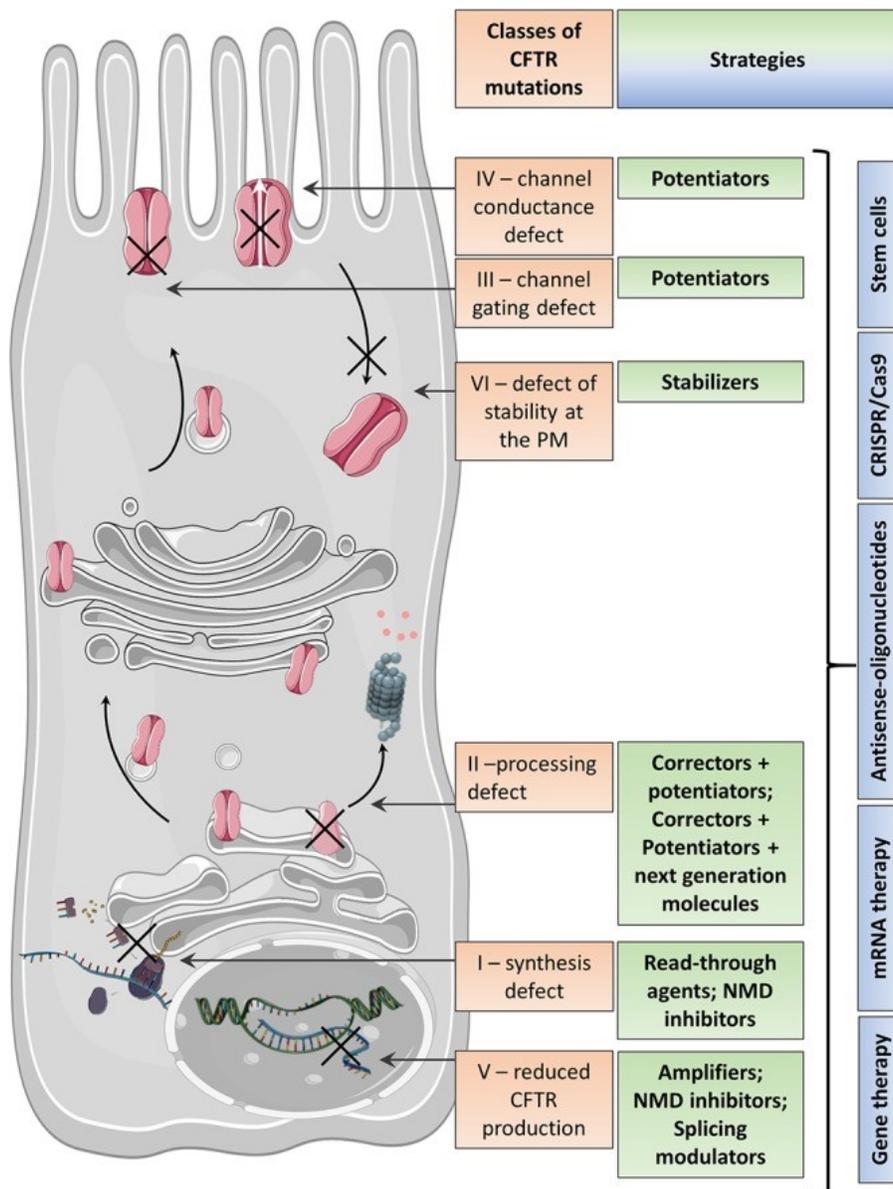
#### 1.2.5.2 Traitements à l'étude

La découverte du gène *CFTR* a mené au développement de nouvelles thérapies dirigées vers le défaut de base de CFTR, mais nombre d'entre elles restent encore à l'étude, telles que les thérapies génique, ARN, antisens, l'approche CRISPR/Cas9 et la thérapie par cellules souches (83,171). La thérapie génique, comme la thérapie AAV (adeno-associated virus) 4D-710 actuellement en phase I clinique, permet de remplacer la mutation en FK avec une version fonctionnelle du gène *CFTR* dans les cellules (172). Plusieurs défis entravent cependant l'efficacité de cette thérapie : l'incapacité de cibler spécifiquement les cellules progénitrices des VA ou d'y délivrer de gros fragments d'ADN, la barrière physique avec le mucus, l'environnement inflammatoire en FK qui limite l'activité de la thérapie, et les risques de réponses pro-inflammatoires ou de mutagénèse insertionnelle (171). Les traitements ciblant l'ARN représentent une autre piste de thérapie pouvant être efficace pour tout type de mutations CFTR, comme la thérapie miARN (173) ou la thérapie ARNm (VX-522, phase I). Elles visent à délivrer de bonnes copies d'ARNm de CFTR aux cellules (172,174), ce qui permettrait une potentielle

régulation et correction de l'expression du gène CFTR à son origine. La thérapie antisens (« antisense-oligonucleotide-mediated therapy ») consiste à synthétiser des portions de brins d'ARN complémentaires aux ARNm pour un gène donné, dans l'objectif de sélectivement modifier l'expression génique (83). L'approche CRISPR/Cas9 vise ici à éditer le gène *CFTR* en corrigeant la séquence mutée avec une nouvelle séquence introduite dans l'ADN. Finalement, la thérapie par cellules souches réside dans l'utilisation de cellules souches pluripotentes non-immunogènes, spécifiques au patient et ayant la capacité de facilement proliférer et être modifiées afin de réparer le défaut ciblé (83).

La restauration de la fonction de CFTR pourrait encore être obtenue par d'autres mécanismes à l'étude ciblant plus spécifiquement certaines classes de mutation de CFTR, comme la thérapie « read-through » pour les mutations non-sens de classe I (ELX-02, phase II) qui vise à stimuler la machinerie cellulaire afin qu'elle passe outre les PTC lors de l'expression de la protéine (172,175,176). L'efficacité de cette thérapie est cependant inhibée par le système de contrôle NMD (« nonsense-mediated mRNA decay ») qui dégrade les ARNm contenant les PTC. L'inhibition de ce système à partir d'inhibiteurs de NMD, des composés actuellement à l'étude, permettrait alors d'améliorer l'efficacité de la thérapie « read-through », mais également la production réduite de CFTR avec les mutations de classe V (177).

D'autres traitements ciblant CFTR sont aussi à l'étude, tels que les stabilisateurs de CFTR, ciblant les mutations de classe VI, avec pour fonction d'ancrer le canal à la membrane afin d'empêcher sa dégradation (178). Les amplificateurs, comme PTI-428, sont un autre type de composés qui aideraient à la fonction de CFTR, en visant les mutations de classe II (comme F508del) et V, et en augmentant l'expression d'ARNm de CFTR, et donc la synthèse sinon dysfonctionnelle de la protéine (178,179). Les dernières avancées quant à la correction de canal dysfonctionnel sont cependant focalisées sur les modulateurs de CFTR, une avenue prometteuse pour le traitement de la FK. L'ensemble de ces traitements à l'étude sont présentés à la figure 12 ci-dessous.



**Figure 12. – Classes de mutations CFTR et stratégies thérapeutiques correspondantes (83)**

### 1.2.5.3 Modulateurs de CFTR

Au vu de leur efficacité clinique, les modulateurs de CFTR représentent une avancée thérapeutique déterminante pour la suite du traitement de la FK, mais aussi une forme d'espoir. Ce dernier point s'illustre par exemple par le nombre de grossesses chez les patientes FK qui a plus que doublé entre 2018 et 2020 après l'approbation du Trikafta, un médicament combinant des modulateurs de CFTR et qui améliore efficacement l'état de santé des patients FK (180). Avant leur approbation, les traitements se résumaient principalement aux thérapies symptomatiques,

des traitements chroniques oppressants au long terme pour les patients (181). Les modulateurs de CFTR sont davantage spécifiques au sens que leur accessibilité pour un patient donné dépend des mutations de CFTR qu'il arbore. Dans une optique de médecine personnalisée, ces derniers sont dirigés vers des mutations précises afin de corriger le défaut de CFTR qui y est associé, en adressant par exemple l'ouverture du canal (potentiateur) ou son repliement et sa maturation (correcteur) (104,174).

Les premières études cliniques sur les modulateurs de CFTR ont d'abord porté sur l'utilisation de correcteurs de CFTR seuls, dirigés spécifiquement vers la mutation F508del. La molécule VRT-325 en est un premier exemple, permettant d'améliorer la maturation de la protéine à la membrane, rétablir le fonctionnement des intégrines et ainsi stimuler la réparation épithéliale en contexte lésionnel (41,70). Cependant, le CFTR-F508del démontre également un défaut d'activation, tournant les recherches vers l'utilisation de potentiateurs de CFTR, démontrant une première efficacité clinique.

Modulator name	Date of US-FDA approval	CFTR mutations for which it is approved	Ages of approval
Ivacaftor	January 2012	G551D	≥6 years
	February 2014	Additional 8 gating mutations: G178R, S549N, S549R, G551S, G1244E, S1251N, S1255P and G1349D	≥6 years
	December 2014	Additional mutation: R117H	≥6 years
	March 2015	All ivacaftor-responsive mutations <sup>a</sup>	≥2 years
	May 2017	Additional 23 residual function ivacaftor-responsive mutations <sup>a,b</sup>	≥2 years
	August 2017	Additional five residual function mutations: 2789 + 5 G > A, 3272-26 A > G, 3849 + 10kbC > T, 711 + 3 A > G, and E831X	≥2 years
	August 2018	Ivacaftor-responsive mutations <sup>a</sup>	≥12 months
	December 2020	Additional 59 ivacaftor-responsive mutations <sup>a</sup>	≥4 months
Lumacaftor/ivacaftor	July 2015	Homozygous F508del	≥12 years
	September 2016	Homozygous F508del	≥6 years
	August 2018	Homozygous F508del	≥2 years
Tezacaftor/ivacaftor	February 2018	Homozygous F508del or at least 1 of 26 additional tez/iva responsive mutations <sup>c</sup>	≥12 years
	December 2020	Additional 127 tez/iva-responsive mutations <sup>c</sup>	≥6 years
Elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor	October 2019	At least one copy of F508del	≥12 years
	December 2020	177 additional ETI-responsive mutations <sup>d</sup>	≥12 years

**Tableau 1. – Accessibilité des modulateurs de CFTR en 2020 selon la FDA (182)**

#### *1.2.5.3.1 Monothérapie Kalydeco*

Le premier des modulateurs de CFTR développé et approuvé cliniquement est l'ivacaftor (VX-770, Kalydeco), en 2012 (Tableau 1). Il agit en tant que potentiateur de CFTR, ayant pour fonction d'améliorer l'ouverture et la conductance du canal en favorisant sa configuration ouverte (174,183). Initialement destiné spécifiquement aux patients FK portant la mutation G551D (classe III), son accessibilité a ensuite été étendue, compte tenu de son efficacité, pour finalement être administré à environ 4% de la population FK, arborant des mutations liées au défaut d'ouverture ou de conductance du canal (97 mutations de classes III et IV).

De nombreux essais cliniques ont démontré les bénéfices du Kalydeco sur la fonction pulmonaire, une amélioration moyenne du VEMS de 10%, ainsi qu'une baisse des exacerbations, des indices clés dans l'état de santé des patients FK. Cette monothérapie permet également d'améliorer leur poids et leur qualité de vie, un ensemble d'effets bénéfiques qui se maintient au long terme (174,183,184).

#### *1.2.5.3.2 Bithérapies Orkambi et Symdeko*

À la suite de cette percée, deux thérapies combinatoires ont vu le jour : lumacaftor/ivacaftor (VX-809+VX-770, Orkambi) et tezacaftor/ivacaftor (VX-661+VX-770, Symdeko), combinant le potentiateur ivacaftor à un correcteur de CFTR, lumacaftor ou tezacaftor (homologues), dans l'espoir d'améliorer davantage le traitement de la FK par effet additif. Ils ont pour fonction d'améliorer le repliement tridimensionnel de la protéine CFTR dans le RE (la faisant échapper au système de dégradation ERAD) et sa translocation à la membrane apicale. Le canal CFTR corrigé est ensuite potentialisé par l'ivacaftor afin de permettre son activation (174,183). Cette approche par bithérapie permet d'adresser la mutation de CFTR prévalente F508del (classe II), causant un défaut de repliement et des problèmes d'ouverture du canal (174).

Orkambi fut la première des deux combinaisons approuvée, en 2015, s'adressant uniquement aux patients FK homozygotes pour la mutation F508del (Tableau 1). Les effets cliniques obtenus par cette combinaison sont modestes, la mesure du VEMS chez les patients FK traités n'augmentant que très faiblement (183), et le médicament pouvant entraîner des effets secondaires importants (185,186). La deuxième combinaison Symdeko fut ensuite approuvée en 2018, pour les patients

FK F508del homozygotes, ou F508del hétérozygotes avec une autre mutation de fonction résiduelle sensible au traitement (154 mutations au total). Bien que son mécanisme d'action soit similaire à celui de l'Orkambi, Symdeko amène une amélioration de la mesure de VEMS légèrement plus élevée (183). Malgré le profil clinique plus ou moins amélioré des patients suivant ces deux bithérapies, leur effet bénéfique reste tout de même modéré.

#### *1.2.5.3.3 Trithérapie Trikafta*

En fin 2019, une nouvelle triple combinaison de modulateurs de CFTR fut alors approuvée pour les patients FK avec au moins une copie de la mutation F508del (la deuxième mutation pouvant être avec fonction résiduelle ou minimale) : elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (VX-445+VX-661+VX-770, Trikafta) (Tableau 1). Dans le but d'obtenir un effet synergique, cette combinaison regroupe l'efficace potentiateur ivacaftor, avec le correcteur tezacaftor et un autre nouveau correcteur de CFTR, elexacaftor. Ce dernier a pour différence de se lier à un autre site de la protéine CFTR que le correcteur tezacaftor, ainsi que de présenter une activité de potentialisation (187–189).

Après essais cliniques, la triple combinaison Trikafta s'avère être la plus efficace des combinaisons de modulateurs de CFTR. En effet, l'amélioration de la fonction pulmonaire grâce au traitement est notable : il permet une augmentation de 14% de la mesure du VEMS, une forte diminution des exacerbations pulmonaires chez les patients, et donc du besoin d'une transplantation pulmonaire (174,190). L'effet bénéfique du Trikafta ne s'arrête pas aux poumons, amenant également une diminution des exacerbations nasales et une amélioration du statut glycémique, du poids et de l'IMC (indice de masse corporelle) des patients (174,191,192). Ces améliorations semblent se maintenir au long terme, et être similaires entre les patients FK F508del homozygotes et hétérozygotes (F508del/autre mutation) (193,194).

Compte tenu de l'efficacité notable du Trikafta au niveau clinique et de sa sûreté, le médicament a été testé chez des patients non porteurs de délétion F508del et a été approuvé en 2020 pour 177 mutations rares de CFTR supplémentaires (182). Le succès des essais cliniques chez les enfants FK de 6 à 11 ans a également mené à l'approbation du Trikafta pour les enfants FK âgés d'au moins 6 ans (195,196). Une dernière étude clinique confirme cependant l'efficacité et la

sûreté du médicament chez des enfants de 2 à 5 ans, abaissant à nouveau l'âge requis pour être éligible au Trikafta à au moins 2 ans (197,198). Une récente étude clinique a également démontré l'efficacité du Trikafta chez des patients FK arborant des mutations non-F508del, actuellement non éligibles pour le traitement (199). Cette découverte rend ce médicament, déjà accessible pour plus de 85% de la population FK, possiblement accessible à davantage de patients dans le besoin (72,183,188,200). Plusieurs effets secondaires liés au Trikafta ont cependant été décrits, tels que de l'urticaire, de l'hypertension, du surpoids, de l'hypervitaminose A, des troubles digestifs, du sommeil et de la santé mentale, requérant possiblement un ajustement du dosage du médicament (201–207). Ces complications peuvent aller jusqu'à mettre en danger la santé des patients FK en souffrant, le Trikafta représentant alors un plus grand coût que bénéfice.

#### *1.2.5.3.4 Modulateurs de CFTR à l'étude*

Plusieurs autres modulateurs de CFTR sont actuellement à l'étude et semblent prometteurs, comme le correcteur VX-659 (208), ou encore le correcteur vanzacaftor (VX-121) et le potentiateur deutivacaftor (VX-561), qui constituent la combinaison vanzacaftor/tezacaftor/deutivacaftor (172). Actuellement en phase III clinique, cette trithérapie a la même fonction de modulation que le Trikafta, mais avec pour objectif d'obtenir des améliorations cliniques supérieures à ce dernier (209). Une autre trithérapie présentement en phase II clinique est également à l'étude, ABBV-2222+ABBV-3067+ABBV-576, une combinaison d'un potentiateur et deux correcteurs avec pour fonction d'également restaurer la fonction de CFTR comme le Trikafta.

#### *1.2.5.3.5 Défis à relever*

La correction fonctionnelle de CFTR par les modulateurs, qui se montre être la stratégie thérapeutique la plus efficace à ce jour, est cependant partielle et variable chez les patients, dépendamment de leur génotype, de gènes modificateurs (210) et de l'environnement infectieux dans leurs VA (147–149). Des études, dont celles de notre équipe, ont en effet démontré que la correction de CFTR était altérée par la présence des VirF sécrétés par *P. aeruginosa* (41,147–149,211,212). Les VirF de cette bactérie atténuent la correction fonctionnelle de CFTR à la membrane de cellules épithéliales des VA, induite grâce aux correcteurs de CFTR VRT-325 et VX-

809 (148,149). La capacité de la combinaison Orkambi (VX-809 + VX-770) à améliorer la réparation de cultures primaires non différenciées ou différenciées de cellules épithéliales des VA, suite à la correction de CFTR, est également altérée en présence des VirF de *P. aeruginosa* (147). La conséquence néfaste des infections bactériennes présentes dans les VA des patients FK doit donc être prise en compte dans le traitement efficace de la maladie grâce aux modulateurs de CFTR.

Effectivement, malgré l'efficacité des modulateurs de CFTR, ces derniers ne peuvent pas totalement empêcher les cycles d'infections bactériennes et d'inflammation des VA qui, associées aux dommages pulmonaires sévères et déclin de la fonction pulmonaire, persistent alors. Enfin, environ 10% de la population FK présente des mutations non éligibles aux traitements approuvés, par exemple les mutations non-sens (classe I) qui causent une absence totale de CFTR à la membrane cellulaire, laissant ces patients dans le cruel besoin que de nouvelles stratégies thérapeutiques soient développées (174,183).

#### 1.2.5.4 Nouvelles avenues thérapeutiques

L'atteinte pulmonaire majeure en FK amène une réelle nécessité de développer de nouvelles thérapies visant à réparer les dommages épithéliaux et restaurer l'intégrité fonctionnelle de l'épithélium. Cela peut être répondu grâce à la correction fonctionnelle de CFTR, mais la réponse à ces traitements modulateurs de CFTR peut être variable et cette option n'est pas disponible pour une portion non-négligeable de patients FK inéligibles, arborant des mutations rares. D'autres approches pro-réparatrices sont alors envisageables et méritent d'être investiguées, et parmi les multiples pistes existantes, les activateurs de canaux potassiques relèvent notre intérêt. Cette avenue a déjà été proposée en tant que nouvelle alternative dans le traitement pour la FK, la stimulation de KvLQT1 permettant la restauration partielle de la sécrétion chlorique par la régulation du gradient électrochimique (213,214). À cette perspective s'ajoutent les travaux de notre équipe, démontrant l'implication de KvLQT1 dans la physiologie des cellules épithéliales et dans les processus de réparation des cellules bronchiques épithéliales, au travers de l'inhibition de sa fonction qui altère la réparation épithéliale (17,29,30,144).

L'activation du canal potassique KvLQT1 peut être médiée par des composés pharmacologiques spécifiques au canal : le R-L3 et le ML277, qui agissent comme activateurs de KvLQT1 en stimulant

l'amplitude du courant du canal et en ralentissant sa désactivation (215,216). D'après nos données préliminaires, le ML277 semble cependant être plus efficace que le R-L3 sur la réparation épithéliale, justifiant mon intérêt pour sa présente étude. Il agit de façon spécifique sur le canal KvLQT1 en se liant à l'interface entre son pore et la bouche de liaison des STM 4 et 5. Une fois lié, le ML277 exerce sa fonction d'activateur par régulation des propriétés d'ouverture du canal KvLQT1, en prolongeant sa position ouverte et en réduisant sa fermeture par inactivation (217,218). Cette activité augmente fortement la perméabilité des ions K<sup>+</sup>, permettant une stimulation drastique des courants potassiques KvLQT1 (217,219). L'effet pharmacologique du ML277 n'a cependant pas été étudié au niveau épithélial et dans un contexte de réparation. Ces récentes découvertes font alors de cet activateur un candidat intéressant afin de moduler activement le KvLQT1, et possiblement stimuler les processus de réparation de l'épithélium des VA en FK.

Les précédents résultats du laboratoire mettent en lumière l'utilité de la correction fonctionnelle du CFTR dans l'amélioration de la réparation de l'épithélium, en contexte lésionnel dans des cultures primaires de cellules épithéliales des VA en FK. Une investigation de l'efficacité de la nouvelle combinaison de modulateurs de CFTR, le Trikafta, semble alors nécessaire. D'autres évidences concernant la fonction des canaux potassiques dans la physiologie pulmonaire tournent notre intérêt vers une autre possible avenue dans l'amélioration de la réparation épithéliale, à travers la modulation de ces canaux comme le KvLQT1. L'efficacité de ces stratégies peut cependant être atténuée par la présence des VirF de bactéries prévalentes en FK, comme *P. aeruginosa* et *S. aureus*, et fait donc l'objet de ma recherche.

## Chapitre 2 – Hypothèses et objectifs

L'intégrité de l'épithélium des VA réside dans la fonctionnalité et la conservation de mécanismes nécessaires à la physiologie du poumon, tels que les processus de réparation épithéliale. Dans un contexte de FK, les mutations de CFTR causent un dysfonctionnement du transport chlorique, et subséquemment de la CMC. Cette anomalie engendre une accumulation de mucus épais et visqueux, obstruant les VA et favorisant les infections pulmonaires et l'inflammation (118). Les VA sont surtout colonisées par les bactéries opportunistes *P. aeruginosa* et *S. aureus*, les deux pathogènes les plus prévalents dans cette pathologie, dont les infections deviennent chroniques, puis persistantes, en partie à cause du défaut de CMC lié à la FK (9,123–125). Ces infections mènent ultimement à des dommages épithéliaux, responsables du déclin de la fonction pulmonaire chez les patients, cause principale de morbidité et mortalité en FK (106,146). La mise au point de stratégies thérapeutiques afin d'améliorer la réparation de l'épithélium, essentielle à la résolution des dommages épithéliaux causés par les infections pulmonaires et l'inflammation chronique dans les VA (perpétués par le défaut de base de CFTR en FK), sont donc essentielles pour la suite du traitement de la maladie.

Nos résultats et la littérature scientifique confirment, d'une part, le rôle essentiel que joue le transport ionique dans la physiologie pulmonaire (17,42,56), et d'autant plus dans la pathologie de la FK, et d'autre part, l'efficacité de la correction de CFTR par les modulateurs de CFTR sur la réparation épithéliale dans des cultures primaires de cellules épithéliales des VA (41,147). La stimulation des transports ioniques de par la modulation des canaux CFTR et KvLQT1, respectivement grâce au Trikafta et ML277, fait de ces deux derniers des cibles thérapeutiques intéressantes afin de possiblement améliorer la restauration de l'intégrité fonctionnelle de l'épithélium en FK. Leur efficacité sur la réparation épithéliale devrait cependant être étudiée en présence des VirF des infections bactériennes, telles que *P. aeruginosa* et *S. aureus*, compte tenu de leur prévalence et possible conséquence néfaste sur l'efficacité de ces modulateurs des canaux ioniques, en plus d'affecter la réparation épithéliale de base (136,147–150,153).

Nous formulons donc, dans un premier temps, l'hypothèse que les VirF des bactéries *P. aeruginosa* et *S. aureus* ont un effet délétère sur la prolifération et les différentes dynamiques de migration cellulaire, participant à la réparation épithéliale. Secondement, nous proposons que les traitements à partir des modulateurs de CFTR Trikafta, de l'activateur de KvLQT1 ML277, ainsi que de la combinaison de ces deux derniers, permettront chacun d'améliorer les processus de réparation épithéliale, et ce, en absence comme en présence des VirF de *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

Ces hypothèses sont adressées à l'aide de souches cliniques de *P. aeruginosa* et *S. aureus*, et des cultures primaires de cellules bronchiques des VA de différents groupes de patients et sujets : des patients FK F508del homozygotes, FK F508del hétérozygotes (F508del/classe I), FK non-F508del (classe I/classe I) et des donneurs sains non-FK. Ces groupes ont été choisis selon leur éligibilité aux approches thérapeutiques étudiées, soit le Trikafta (patients FK F508del/F508del et F508del/classe I) ou le ML277 (patients FK F508del/classe I et classe I/classe I, et sujets non-FK), ainsi que la combinaison des deux. Mes objectifs étaient donc de :

- 1) Approfondir notre compréhension de l'impact des VirF bactériens de *P. aeruginosa* et *S. aureus* sur la prolifération et les dynamiques de migration cellulaire dans la réparation épithéliale
- 2) Étudier les effets de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta et de l'activateur de KvLQT1 ML277 sur la réparation épithéliale à différents stades en FK (prolifération et migration cellulaires, participant à la fermeture lésionnelle), et ce, en présence des VirF des bactéries *P. aeruginosa* et *S. aureus*
- 3) Étendre l'étude de ces stratégies thérapeutiques en investiguant le potentiel d'amélioration de la réparation épithéliale de la combinaison du Trikafta et du ML277 en FK, ainsi que du ML277 chez des patients FK et sujets non-FK infectés, deux groupes non-éligibles aux traitements existants.

Cette analyse de la réparation épithéliale a été menée, suite à des lésions, à partir de mesures de vitesses de réparation des plaies, de la prolifération cellulaire, et des dynamiques de migration guidée cellulaire, tous des paramètres clés à une réparation efficace de l'épithélium des VA.

## **Chapitre 3 – Matériel et méthodes**

### **3.1 Collecte des données et échantillons humains suite aux transplantations pulmonaires**

#### **3.1.1 Approbation du comité d'éthique de la recherche (CER) au Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)**

La collecte d'échantillons explantés de patients FK lors des transplantations pulmonaires réalisées au CHUM et de biopsies de donneurs sains (sujets non-FK), ainsi que la collecte des données cliniques de ces patients, a été approuvée par le CER du CHUM, après obtention de leur consentement éclairé et écrit (#CE 08.063). L'ensemble de ce matériel est conservé dans la Biobanque de tissus et cellules respiratoires du Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM), dirigée par Dre Emmanuelle Brochiero.

#### **3.1.2 Bases de données**

La collecte des données épidémiologiques et cliniques des patients FK et donneurs sains y ayant consenti, a été réalisé à partir de deux bases de données : Transplant 7 et Oacis. Celles-ci regroupent les informations concernant le profil épidémiologique et clinique des donneurs et receveurs de poumons (âge, sexe biologique, statut tabagique, mutations (pour les patients FK), possibles infections bactériennes antérieures à *P. aeruginosa* et *S. aureus*, entre autres), tout en assurant l'anonymat de leurs données nominatives à l'aide d'un code d'identification unique.

#### **3.1.3 Sélection des cellules primaires épithéliales bronchiques**

Les cellules des sujets sélectionnés ont été isolées directement des tissus pulmonaires frais explantés lors des transplantations pulmonaires (section 1.4), ou provenaient de cryovials de cellules isolées de transplantations passées, stockées à -80°C dans la Biobanque de tissus et cellules respiratoires du CRCHUM. Le choix des cellules primaires a été déterminé selon les informations cliniques des sujets (mutations, âge, sexe). Le sexe biologique des sujets choisis

expérimentalement a été pris en compte afin de respecter au mieux une répartition égale femmes/hommes. Les mutations pour le gène *CFTR* sont également considérées selon le traitement auquel elles seront soumises. Différents groupes ont donc été formés pour les patients F508del homozygotes (F508del/F508del), F508del hétérozygotes avec une autre mutation de classe I (F508del/621+1G>T ou F508del/711+1G>T) et non-F508del (un patient 711+1G>T/G542X). Selon l'expérience, le nombre exact de n patients/donneurs et N images/cellules est précisé en légende des figures.

### **3.1.4 Collecte et dissection des explants pulmonaires de patients FK et tissus de donneurs sains lors des transplantations pulmonaires**

À la suite de transplantations pulmonaires réalisées au CHUM, les poumons de patients FK et des segments de bronches de donneurs sains (non utilisés lors de la greffe) ont été récoltés à des fins de recherche au laboratoire. Les poumons ont été finement disséqués de sorte à en isoler l'arbre bronchique pulmonaire, qui a été rincé au PBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, É-U) afin d'en retirer l'excès de sang. Les morceaux de bronches ont ensuite été incubés pendant 10 minutes dans du MEM (Minimal Essential Medium; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) complet, contenant 500 µg/mL de DTT (Dithiothréitol; Sigma-Aldrich, MO, É-U), 10 µg/mL de DNase I (Sigma-Aldrich) et un mélange de différents antibiotiques et antifongiques, selon la nature de l'échantillon (FK ou non-FK). Dans le cas de bronches provenant d'un patient FK, l'antibiogramme personnel de ce dernier (obtenu à partir des bases de données OACIS du CHUM) a été pris en compte, afin d'adapter au mieux le traitement antibiotique et antifongique à des fins de décontamination des échantillons. Quant aux morceaux de bronches provenant de donneurs sains, un mélange de base composé des antibiotiques Ceftazimide (100 µg/mL), Sulfaméthoxazole (80 µg/mL), Triméthoprim (16 µg/mL), Tobramycine (80 µg/mL) et Vancomycine (100 µg/mL), et des antifongiques Fluconazole (25 µg/mL) et Amphotéricine B (1 µg/mL), a été utilisé.

Après cette première incubation des bronches s'ensuit une seconde, encore une fois dans du milieu MEM contenant les antibiotiques et antifongiques spécifiques à la nature des bronches, mais avec également 1.103 µg/mL de Protéase E (pronase, collagénase XIV de Streptomyces

griseus; Sigma-Aldrich) et 10 µg/mL de DNase I, et ce, sous agitation et à l'abri de la lumière à 4°C pendant un maximum de 18 heures.

### **3.2 Isolation des cellules primaires épithéliales bronchiques**

Après effet de la protéase-DNase, son activité a été arrêtée avec 20% de FBS (« Fetal Bovine serum »; Wisent Bioproducts, QC, CA) avant de procéder à l'isolation des cellules épithéliales des VA humaines (147). À l'aide d'un scalpel, l'intérieur des bronches de patients FK et donneurs sains a été gratté pour décoller un maximum de feuillets épithéliaux. La suspension cellulaire obtenue a été resuspendue dans le milieu originel de digestion et centrifugée à 500 g pendant 5 à 10 minutes, selon la quantité de cellules isolées. Si une couche d'hématies était présente, le culot cellulaire obtenu a été resuspendu dans du tampon de lyse ACK (0,1 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 µM KHCO<sub>3</sub>, 10 nM EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) ; pH 7,2 à 7,4) à 4°C pendant 5 minutes. L'activité enzymatique a ensuite été neutralisée par du FBS, et la suspension cellulaire de nouveau centrifugée à 500 g pendant 5 minutes, pour finalement obtenir un culot sans globules rouges. Celui-ci a alors été resuspendu dans un milieu de culture favorisant l'adhérence cellulaire, soit un mélange 1:1 (volume) de PneumaCult Ex (StemCell Technologies, Vancouver, CB, CA) et CnT-17 (CellnTec Advances Cell Systems Bern, Suisse), complété avec un mélange d'antibiotiques et antifongiques, déterminé selon la nature des cellules primaires isolées (FK ou non-FK ; section 1.4).

Les amas cellulaires restants ont été dissociés à l'aide d'une seringue de 1 mL à laquelle était rattachée une aiguille 21 G afin de réaliser plusieurs allers-retours et ainsi obtenir le maximum de cellules isolées. Ces dernières ont alors été comptées grâce à une coloration au bleu Trypan (Gibco) et un hémacytomètre, puisensemencées à une densité de 4.10<sup>6</sup> cellules sur des flasques de 75cm<sup>2</sup> (T75; Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne) recouvertes de PureCol (40 µg/mL; Cedarlane Laboratories, Burlington, ON, CA) et collagène de type IV (5 µg/mL; Sigma-Aldrich) afin d'expandre leur nombre.

### 3.3 Culture des cellules primaires épithéliales bronchiques

Afin de favoriser la prolifération des cellules épithéliales, celles-ci ont été cultivées dans un milieu de culture CnT-17, remplacé toutes les 48 heures dans les flasques T75 jusqu'à confluence cellulaire, et complété avec le mélange d'antibiotiques et antifongiques correspondant pour les cellules en culture, sur les 5 premiers jours d'expansion cellulaire. Lorsqu'une confluence générale a été obtenue, les monocouches de cellules ont été rincées deux fois avec du PBS, et les cellules ont été décrochées de la matrice avec une solution de trypsine 0,05% et EDTA (Gibco) pendant 5 minutes à 37°C. L'activité enzymatique de celle-ci a alors été arrêtée avec une solution de F-12 (Gibco) et FBS 10% et la suspension cellulaire a été centrifugée à 500 g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire obtenu a été resuspendu dans du milieu PneumaCult Ex pour procéder au comptage cellulaire (avec coloration au bleu Trypan et utilisation d'un hémacytomètre) et à un nouvel ensemencement des cellules, à une densité de  $2 \cdot 10^6$  cellules sur des flasques T75, pour une seconde expansion cellulaire.

Une fois le second passage cellulaire réalisé, les cellules ont étéensemencées pour expérimentation sur des plaques de 24 puits (p24; Corning, NY, É-U), recouvertes de PureCol et collagène de type IV, à une densité de 30 000 cellules par puits. Un suivi régulier de l'état de croissance des cellules a été effectué. Celles-ci ont d'abord été cultivées dans un mélange composé à 1:1 (volume) de PneumaCult Ex et CnT-17, afin de favoriser l'adhérence cellulaire. Quand les cellules semblaient bien adhérentes au support à l'observation microscopique, leur milieu de culture a été changé pour du Cnt-17 de sorte à promouvoir la prolifération cellulaire. Lorsqu'une confluence cellulaire est finalement obtenue dans l'ensemble des monocouches cellulaires, celles-ci ont alors été cultivées dans le milieu de culture BEGM (Bronchial Epithelial cell Growth Medium; Lonza), un mélange de BEBM (Bronchial Epithelial cell Basal Medium; Lonza) et DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco), à un ratio de 1:1 (volume), supplémenté avec  $5 \cdot 10^{-4}$  µg/mL d'EGF, 5 µg/mL d'insuline, 0,5 µg/mL d'hydrocortisone, 10 µg/mL de transferrine, 0,5 µg/mL d'épinéphrine, 6,5 µg/mL de triiodothyronine, 130 µg/mL d'extrait pituitaire bovin, 1,5 µg/mL de BSA (Bovine Serum Albumin; Sigma-Aldrich), 0,1 nM d'acide

rétinoïque (Sigma-Aldrich), 100 U/mL de pénicilline (Gibco) et 100 µg/mL de streptomycine (Gibco).

### **3.4 Traitement des cultures primaires épithéliales bronchiques**

Après au moins 48 heures de culture des cellules épithéliales FK et non-FK en milieu de culture BEGM, et une confluence générale constatée dans l'ensemble des monocouches cellulaires, celles-ci ont été prétraitées pendant 24 heures, tel que décrit ci-dessous. Afin d'éviter une perte de viabilité des cellules épithéliales si elles étaient directement exposées aux bactéries vivantes pendant une période prolongée, et parce que ces cellules ne sont souvent pas exposées directement aux bactéries piégées dans le mucus, mais plutôt à leurs VirF (126), nos expérimentations ont été réalisées en présence de filtrats bactériens contenant les exoproduits sécrétés dans les cultures de *P. aeruginosa* ou *S. aureus*. Plus précisément, les VirF ont été collectés respectivement à partir des cultures bactériennes des souches cliniques PACF508 (section 3.5) et SA29213 (section 3.6). En condition contrôle, les cultures épithéliales ont été exposées au véhicule seul, soit le milieu de culture bactérien LB (Lysogeny Broth) Lennox (RI-MUHC, Montréal, QC, CA).

Des traitements des cellules épithéliales ont également été effectués avec la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta (Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor) et/ou l'activateur du canal potassique KvLQT1 ML277. En condition contrôle, les cultures épithéliales ont été exposées au véhicule DMSO (Diméthylsulfoxyde; Sigma-Aldrich) (section 3.7).

Après 24 heures de prétraitement, des plaies mécaniques ont été réalisées sur les monocouches cellulaires, les cellules détachées ont été éliminées par aspiration puis rinçage, puis les traitements détaillés ci-dessus (VirF bactériens de *P. aeruginosa* ou *S. aureus*, en présence ou non des modulateurs de canaux ioniques CFTR et/ou KvLQT1) ont été renouvelés afin d'évaluer leur impact sur les processus de réparation épithéliale (section 3.8).

### **3.5 Culture bactérienne de la souche clinique de *P. aeruginosa* PACF508**

Les VirF de *P. aeruginosa* utilisés expérimentalement ont été obtenus à partir de la culture bactérienne d'un isolat mucoïde clinique, récupéré à partir des expectorations d'un patient FK F508del homozygote (PACF508 (220), Hôpital Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada). Les bactéries PACF508 ont été cultivées dans le laboratoire de notre collaboratrice, Dr Dao Nguyen (CUSM, McGill, Montréal) sur gélose LB (Lysogeny Broth) à 37°C, jusqu'à l'obtention d'une valeur de densité optique (DO) à 600 nm de 2,5 unité arbitraire (UA), avec un nombre de CFU (unité formant colonie) aux alentours de  $5,5 \times 10^9$ /mL. Les colonies en résultant ont été inoculées dans le milieu de culture LB Lennox et cultivées sous agitation à 250 rpm (rotations per minute) à 37°C.

Après 24 heures de croissance, les suspensions bactériennes ont été centrifugées à 10 000 g pendant 10 minutes à température ambiante (TA) et les surnageants obtenus ont été filtrés avec des filtres en acétate de cellulose de 0,22 µm à faible liaison protéique (Corning) afin d'en éliminer les bactéries et récolter les VirF sécrétés, qui ont été stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

### **3.6 Culture bactérienne de la souche clinique de *S. aureus* SA29213**

Les VirF de *S. aureus* utilisés expérimentalement ont été obtenus à partir de la culture bactérienne de la souche clinique *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (souche 29213 Rosenbach, ATCC, Manassas, VA, É-U), une souche référence provenant d'un isolat d'une plaie chronique. Les bactéries SA29213 ont été cultivées par le laboratoire de notre collaborateur, Dr François Malouin (U. Sherbrooke) sur gélose LB à 37°C, jusqu'à l'obtention d'une valeur de DO à 600 nm de 6 UA, avec un nombre de CFU aux alentours de  $8,5 \times 10^9$ /mL. Les colonies obtenues ont été inoculées dans le milieu de culture LB Lennox et cultivées sous agitation à 250 rpm à 37°C.

Après 24 heures de croissance, les suspensions bactériennes ont été centrifugées à 7 800 g pendant 10 minutes à TA et les surnageants obtenus ont été filtrés avec des filtres en acétate de cellulose de 0,22 µm à faible liaison protéique (Corning) afin d'en récolter les VirF sécrétés, qui ont été stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

### **3.7 Traitements avec la combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta et avec l'activateur de KvLQT1 ML277**

Les cultures épithéliales bronchiques provenant de patients FK F508del homozygotes et F508del hétérozygotes (F508del/621+1G>T, F508del/711+1G>T) ont été exposées à la triple combinaison de modulateurs de CFTR entrant dans la composition du Trikafta, soit les correcteurs elexacaftor (2  $\mu$ M VX-445; Selleck Chemicals, TX, É-U) et tezacaftor (3  $\mu$ M VX-661; Selleck Chemicals), et le potentiateur ivacaftor (0,1  $\mu$ M VX-770; Selleck Chemicals), avec le véhicule DMSO.

Les cultures cellulaires de donneurs sains, de patients FK F508del hétérozygotes (F508del/621+1G>T, F508del/711+1G>T) et du patient FK non-F508del (711+1G>T/G542X) ont été traitées avec l'activateur de KvLQT1, le ML277 (4  $\mu$ M; Tocris Bioscience, Bristol, R-U), dilué dans le véhicule DMSO.

Les cultures cellulaires de patients FK F508del hétérozygotes ont été également exposées à la combinaison du Trikafta et du ML277.

### **3.8 Lésions mécaniques et réparation épithéliale**

Selon une technique hautement reproductible (41,147,150,221), des plaies mécaniques ont été réalisées à l'aide d'un embout de pipette 10  $\mu$ L sur les monocouches confluentes de cellules épithéliales post-traitement, afin de mesurer les processus de réparation épithéliale. Plus exactement, au centre de chacun des puits des plaques 24 puits utilisées comme supports expérimentaux, deux plaies horizontales, parallèles et uniformes ont été effectuées. Des marques sur le fond du support permettent la prise de photos (au grossissement de microscope 40X), au temps initial et après réparation, exactement au même endroit, de façon à pouvoir comparer précisément les aires des lésions avant et après réparation. Ainsi, la vitesse de fermeture des plaies, mesurée sur 6 heures en  $\mu$ m<sup>2</sup>/h à partir de leur prise en photo à temps 0h (heure) et 6h, est calculée selon la différence des aires de surface entre ces deux temps, déterminées grâce au logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, É-U). Un total de 12 répliques

techniques par condition par patient/donneur est réalisé : 3 photos/plaie, 2 plaies/puits et 2 puits/condition.

### **3.9 Évaluation de la prolifération cellulaire au sein d'une monocouche en réparation par immunomarquage**

Des cultures épithéliales de patients FK et donneurs sains ont été cultivées dans des chambres de culture LAB-TEK à 8 puits (Sarstedt), sur lesquelles 2 plaies mécaniques (section 3.8) par puits/condition ont été réalisées, dans l'optique de mesurer la prolifération cellulaire des monocouches en processus de réparation grâce à un marquage par immunofluorescence (41,150).

Après 6 heures de réparation, les cultures primaires de cellules ont été rincées au PBS et fixées pendant 15 minutes avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% à TA, dilué dans du PBS à partir de PFA 20% (Electron Microscopy Sciences, Thermo Fisher Scientific). Suite à un deuxième rinçage au PBS, les cellules ont été incubées dans du Triton (Amersham Biosciences), à une dilution 1:1000 en PBS, pendant 10 minutes à TA. Puis, après deux nouveaux rinçages PBS, elles ont été recouvertes d'une solution de saturation, composée de 10% de BSA et 10% de FBS, pour une période de 1 heure à TA. En parallèle a été préparée la solution d'anticorps primaire anti-Ki67 (Dako, Danemark) à une dilution 1:100 dans la solution de saturation. Une fois l'heure de saturation écoulée, la solution a été retirée pour incuber les cellules en présence de l'anticorps primaire, et ce, à 4°C pour la nuit.

Le lendemain, et jusqu'à leur analyse quantitative, les monocouches de cellules épithéliales ont été manipulées dans l'obscurité. Après trois rinçages au PBS et 30 minutes de saturation à TA, celles-ci ont été incubées avec l'anticorps secondaire couplé à des fluorochromes d'âne anti-souris Alexa Fluor 488™ (Invitrogen, Thermo fisher Scientific), dilués à un ratio de 1:200 en solution de saturation, pendant 1 heure et 30 minutes à TA. S'ensuivent 3 nouveaux rinçages au PBS, une courte saturation de 15 minutes à TA, et une incubation des cellules en 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Molecular probes, Life Technologies, OR, É-U), à une dilution 1:1000 en solution de saturation, pendant 10 minutes à TA, afin de marquer les noyaux (222). Enfin, après

trois derniers rinçages au PBS, la solution de contre-coloration des noyaux recouvrant les cellules a été aspirée, et celles-ci ont été montées en lame avec des lamelles 24x60 mm de 1 pouce d'épaisseur, fixées avec la résine anti-décoloration Prolong® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Les lames montées ont été laissées à sécher pendant 2 jours en obscurité avant d'être observées au microscope à épifluorescence.

### **3.10 Analyse quantitative de la prolifération cellulaire**

Après le marquage des cellules par immunofluorescence, les cellules ont été observées au microscope à épifluorescence (Olympus, Richmond Hill, Ontario, CA) au grossissement 100X, et prises en photo avec une caméra de haute qualité QImaging (EXi Aqua Manual Rev 1.0, Teledyne Photometrics, AZ, É-U) à partir du logiciel Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, MD, É-U). Pour chacune des conditions expérimentales, 10 images en bord de plaie du marquage de prolifération Ki67 ont été prises en photo, avec 10 autres images du marquage des noyaux cellulaires (DAPI) prises aux mêmes positions respectives. Les photos ont été analysées à l'aide du logiciel ICY (Institut Pasteur, France). Le protocole d'analyse ICY établi au sein du laboratoire permet de quantifier l'émission du signal spécifique par les zones d'intérêt, parmi la totalité des noyaux cellulaires marqués au DAPI (41,150).

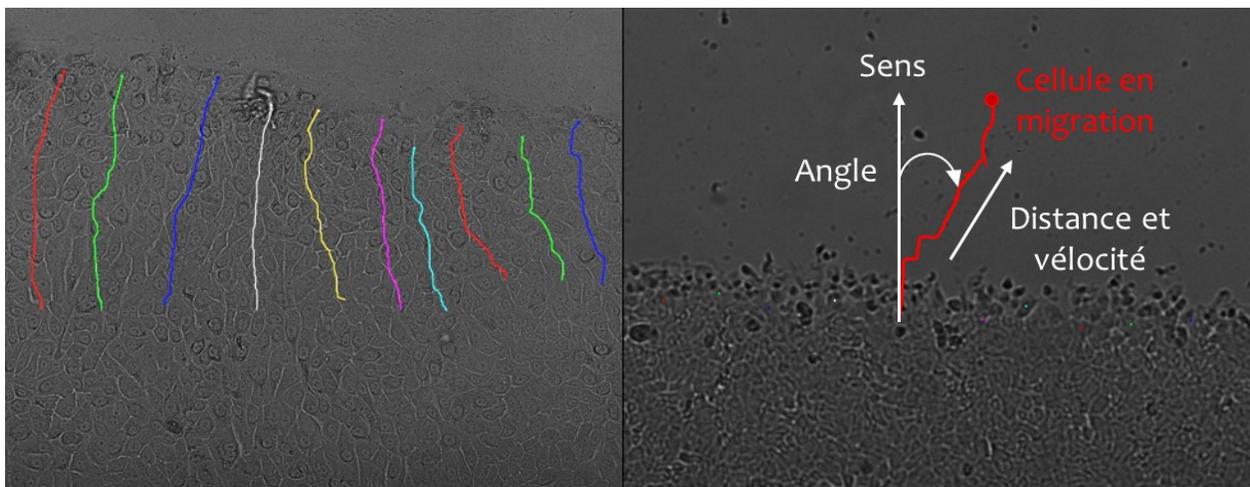
### **3.11 Migration guidée cellulaire**

Selon la même méthode de lésion épithéliale (section 3.8), des plaies mécaniques ont été réalisées sur des plaques de 24 puits (2 plaies/puits) afin d'analyser la dynamique de migration de cellules unitaires dans une monocouche en réparation suite à des lésions (150). Sur une période de réparation de 12 heures, afin d'observer au mieux le potentiel bénéfique des traitements thérapeutiques sur les multiples paramètres de la migration guidée de cellules, cette dernière a été suivie par vidéomicroscopie au microscope « time-lapse » (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) selon un procédé précis décrit ci-dessous.

Au microscope (grossissement 100X), 6 zones en bord de plaie (front épithélial) ont été établies par puits en duplicata, pour un total de 12 répliques techniques par condition par patient/donneur.

Des images au microscope ont été prises à chacune de ces positions, à intervalle de 10 minutes entre les mêmes positions, et ce pendant 12 heures, à l'aide d'une caméra haute-définition motorisée (Photometrics CoolSNAP EZ) et du logiciel AxioVision (AxioVs40x64 V 4.9.1.0), produisant ainsi une vidéo de 73 images successives par position.

Pour chacune de ces vidéos, à l'aide de la fonction de suivi manuel (« manual tracking ») du logiciel ImageJ, 10 cellules réparties sur l'ensemble du bord de la plaie ont été suivies manuellement pendant leur migration, pour un total de 120 suivis unicellulaires par condition par patient/donneur. Les coordonnées des points de « tracking » de chacun de suivis unicellulaires réalisés, obtenues par ImageJ, se traduisent en tracés des trajectoires des migrations cellulaires, qui sont ramenés à l'origine dans un repère orthonormé à partir du point de départ de migration, grâce à Chemotaxis and Migration Tool (IBIDI). À partir de ces suivis unicellulaires, le logiciel nous permet également d'extraire les données de différents paramètres de migration guidée, tels que la distance parcourue par les cellules, leur vitesse et leur angle de migration. Les coordonnées de migration obtenues par ImageJ nous renseignent également sur la déviation des cellules en migration par rapport au sens de migration propice pour refermer la plaie (Figure 13).



**Figure 13. – Exemple de suivis unitaires de cellules d'une zone en bord de plaie pendant 12 heures de réparation (gauche) et paramètres de migration guidée obtenus par ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool : distance et vitesse de migration, angle de migration, et déviation par rapport au sens de migration (droite).**

### 3.12 Analyses statistiques

Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM (Standard Error of the Mean), avec le nombre d'expériences (n patients/donneurs et N images/cellules) indiqué en légende des figures. Les analyses statistiques des résultats ont été réalisées à partir du logiciel GraphPad Prism version 9 pour Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, É-U). Différentes analyses statistiques des résultats de réparation épithéliale, prolifération cellulaire et migration guidée cellulaire ont été réalisées selon le nombre de groupes. Pour les comparaisons entre deux groupes, les tests statistiques Mann-Whitney (non-apparié, non-paramétrique), test-t non-apparié (paramétrique) et test-t apparié (paramétrique) ont été utilisés. Au-delà de deux groupes, les tests Kruskal-Wallis (non-apparié, non-paramétrique), Ordinary one-way ANOVA (non-apparié, paramétrique) et Repeated Measures (RM) one-way ANOVA (apparié, paramétrique) ont été adoptés, suivis des tests post hoc Dunn (pour Kruskal-Wallis) et Šidák (pour one-way ANOVA) pour comparaisons multiples afin de déterminer les différences statistiquement significatives entre les conditions d'une même expérience. Un test statistique considéré significatif est associé à une valeur de \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 et \*\*\*\*P < 0,0001.

## Chapitre 4 – Résultats

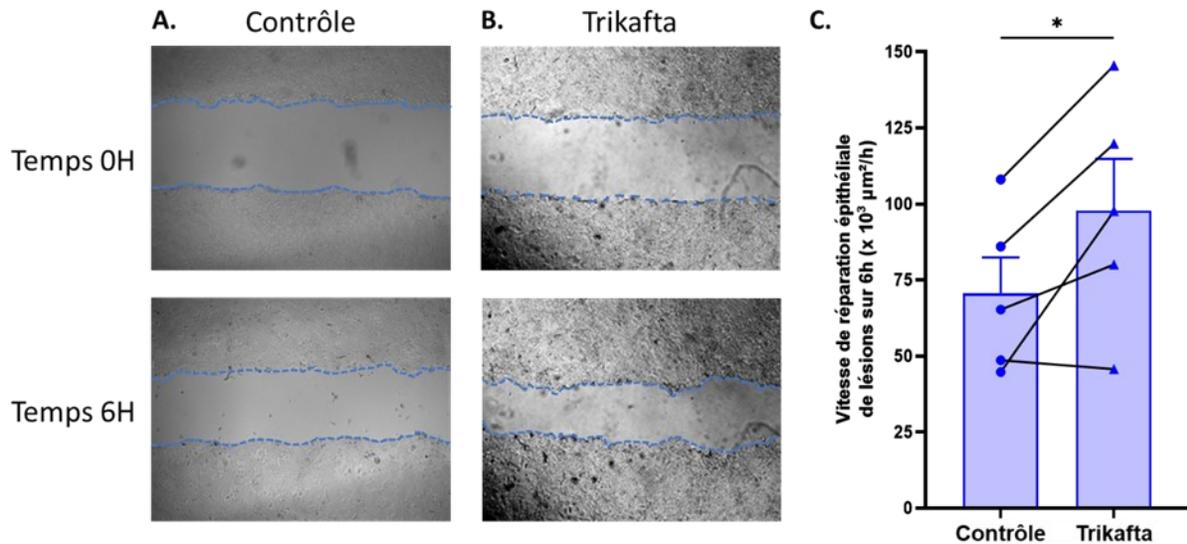
Dans le cadre de mon projet de maîtrise, les processus de réparation épithéliale ont été disséqués, à partir de cellules primaires bronchiques humaines, en analysant la vitesse de réparation suite à des lésions mécaniques, la quantification de la prolifération cellulaire et les dynamiques de migration guidée cellulaire au sein de monocouches en réparation. Ces phénomènes ont été évalués en présence ou non de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta (combinaison elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor) et/ou de l'activateur du canal KvLQT1 (ML277), et ce, sur les cultures primaires cellulaires bronchiques de différents groupes de patients. Ces cultures ont également été exposées aux VirF de *P. aeruginosa* ou *S. aureus*, les bactéries prévalentes chez les patients atteints de FK (223), afin d'examiner leur impact sur l'efficacité des traitements aux modulateurs des canaux CFTR et KvLQT1 visant à améliorer les processus de réparation épithéliale.

### **4.1 Effets de la combinaison Trikafta sur les processus de réparation de cultures primaires bronchiques de patients FK F508del homozygotes**

Des données précédentes du laboratoire ont apporté la preuve de concept que la correction fonctionnelle de la protéine CFTR mutée F508del par les modulateurs de CFTR permettait d'améliorer la réparation épithéliale, une fonction physiologique essentielle du poumon sinon altérée par le défaut de base de CFTR (41,147). L'efficacité de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur la réparation épithéliale a récemment été étudiée dans des cultures de lignées cellulaires (212), mais jamais dans des cultures primaires jusqu'à présent. Elle a alors été analysée sur des cultures cellulaires bronchiques de patients FK F508del homozygotes lésées mécaniquement.

En se penchant tout d'abord sur la fermeture des lésions épithéliales en condition non infectieuse, on constate que le Trikafta améliore de façon significative la vitesse de réparation (Fig. 14C). La

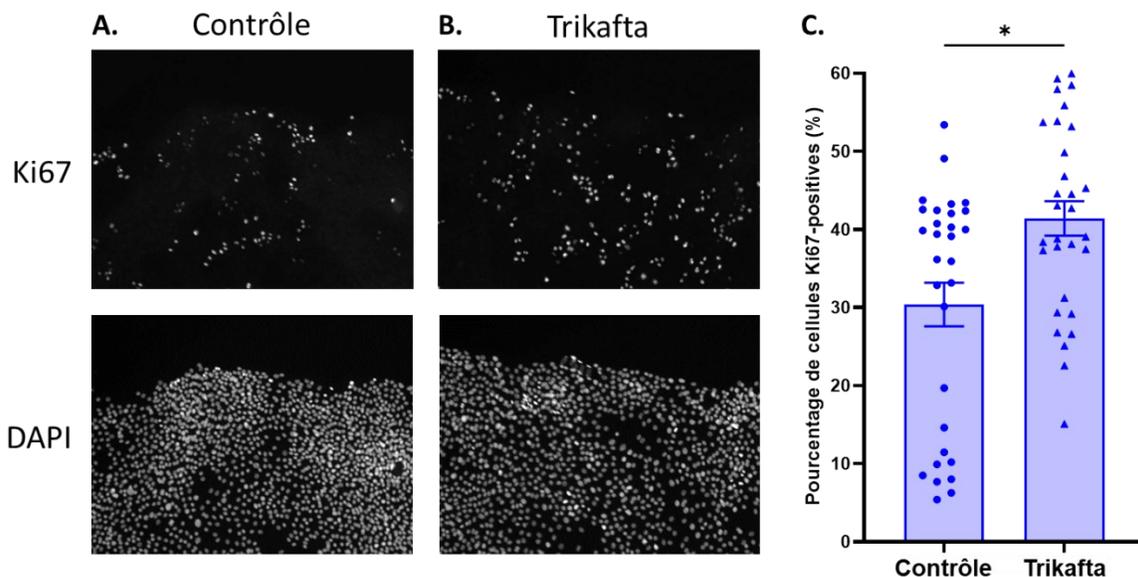
majorité des cultures cellulaires des patients FK (n = 4 sur 5) démontre en effet une réponse positive au traitement.



**Figure 14. – Effet de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur la fermeture de lésions de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK F508del homozygotes.**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires avec la combinaison Trikafta (2 µM VX-445, 3 µM VX-661, 0,1 µM VX-770) ou le véhicule DMSO (condition contrôle), les cultures primaires de cellules bronchiques de patients FK F508del/F508del ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau au Trikafta ou au DMSO. La fermeture des lésions (après 6 heures de réparation) a été mesurée à partir du logiciel ImageJ. Photos représentatives du temps initial après lésion (Temps 0H) et après 6H de réparation (Temps 6H), de monocouches de cellules bronchiques en condition contrôle (DMSO) (A) ou traitées à la combinaison Trikafta (B), au grossissement 40X. C. Comparaison des vitesses de réparation des lésions épithéliales (n = 5 patients; test-t apparié). \*P < 0,05.

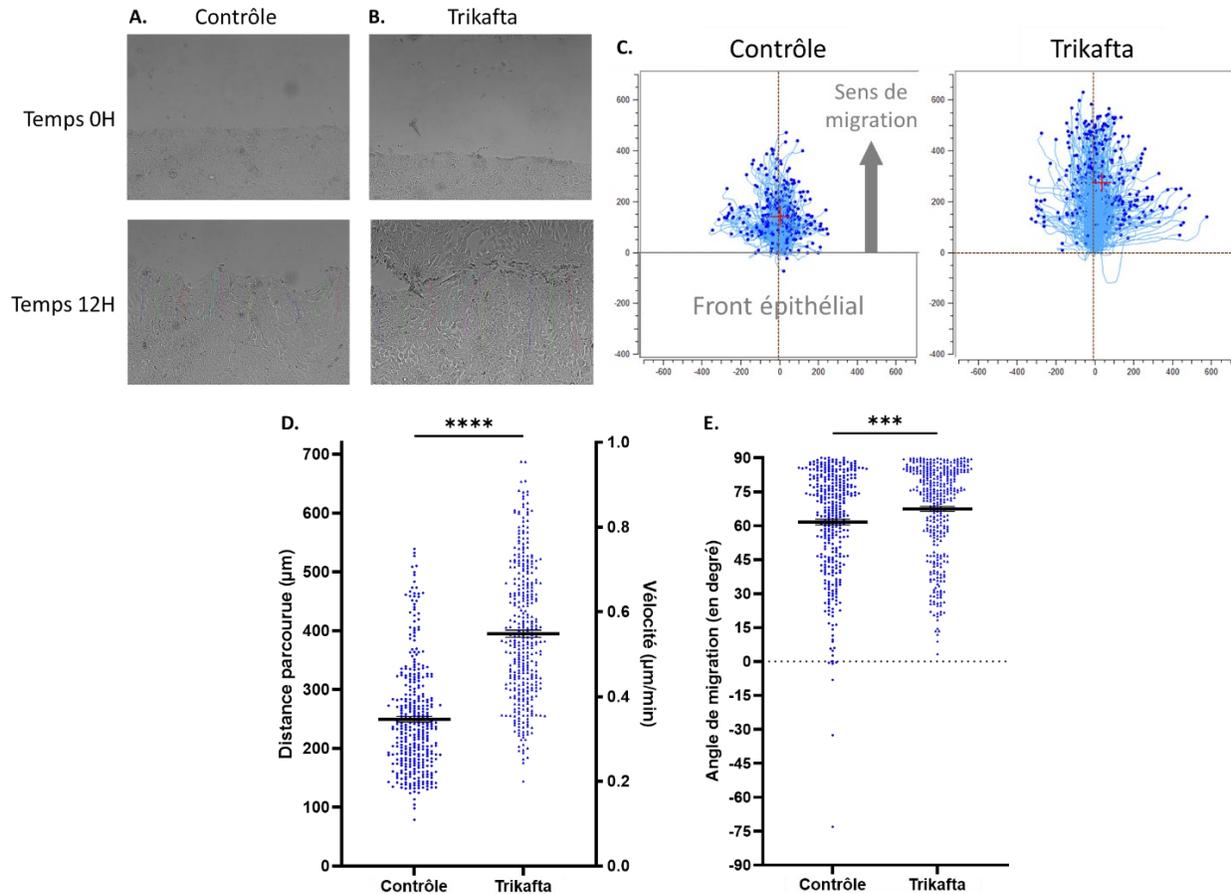
Tel que rapporté à la figure 15, la correction du CFTR par le Trikafta permet également d'augmenter de façon significative le nombre de cellules prolifératives (positives au Ki-67) au sein de la monocouche en réparation.



**Figure 15. – Effet de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur la prolifération de cultures de cellules épithéliales bronchiques de patients FK F508del homozygotes en cours de réparation.**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires avec la combinaison Trikafta (2  $\mu$ M VX-445, 3  $\mu$ M VX-661, 0,1  $\mu$ M VX-770) ou le véhicule DMSO (condition contrôle), les cultures primaires de cellules bronchiques de patients FK F508del/F508del ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau au Trikafta ou au DMSO. La prolifération cellulaire en bord de plaie (après 6 heures de réparation) a été quantifiée selon le pourcentage de cellules positives à l’immunomarquage anti-Ki67, normalisé par le nombre total de cellules marquées au DAPI, à partir du logiciel ICY. Photos représentatives de la prolifération des cellules Ki67-positives en condition contrôle (DMSO) (A) ou traitées à la combinaison Trikafta (B), au grossissement 100X. C. Quantification de la prolifération cellulaire (n = 3 patients; N = 30 images; test Mann-Whitney). \* $P < 0,05$ .

Une évaluation des dynamiques de migration cellulaire a ensuite été réalisée afin de confirmer l’effet bénéfique du Trikafta sur la migration guidée, un paramètre clef pour une réparation épithéliale efficace. Les trajectoires de migration de cellules en bord de plaie (Fig. 16C) indiquent que les cellules migrent sur une plus grande distance grâce au traitement. Une analyse quantitative Chemotaxis confirme en effet que la distance et la vélocité des cellules sont significativement augmentées suite à l’ajout du Trikafta (Fig. 16D). L’angle de migration (Fig. 16E) est également amélioré grâce au traitement (sachant que plus l’angle de migration est proche de 90°, donc perpendiculaire à l’axe des abscisses, plus les cellules tendent à migrer vers la plaie afin de la refermer).



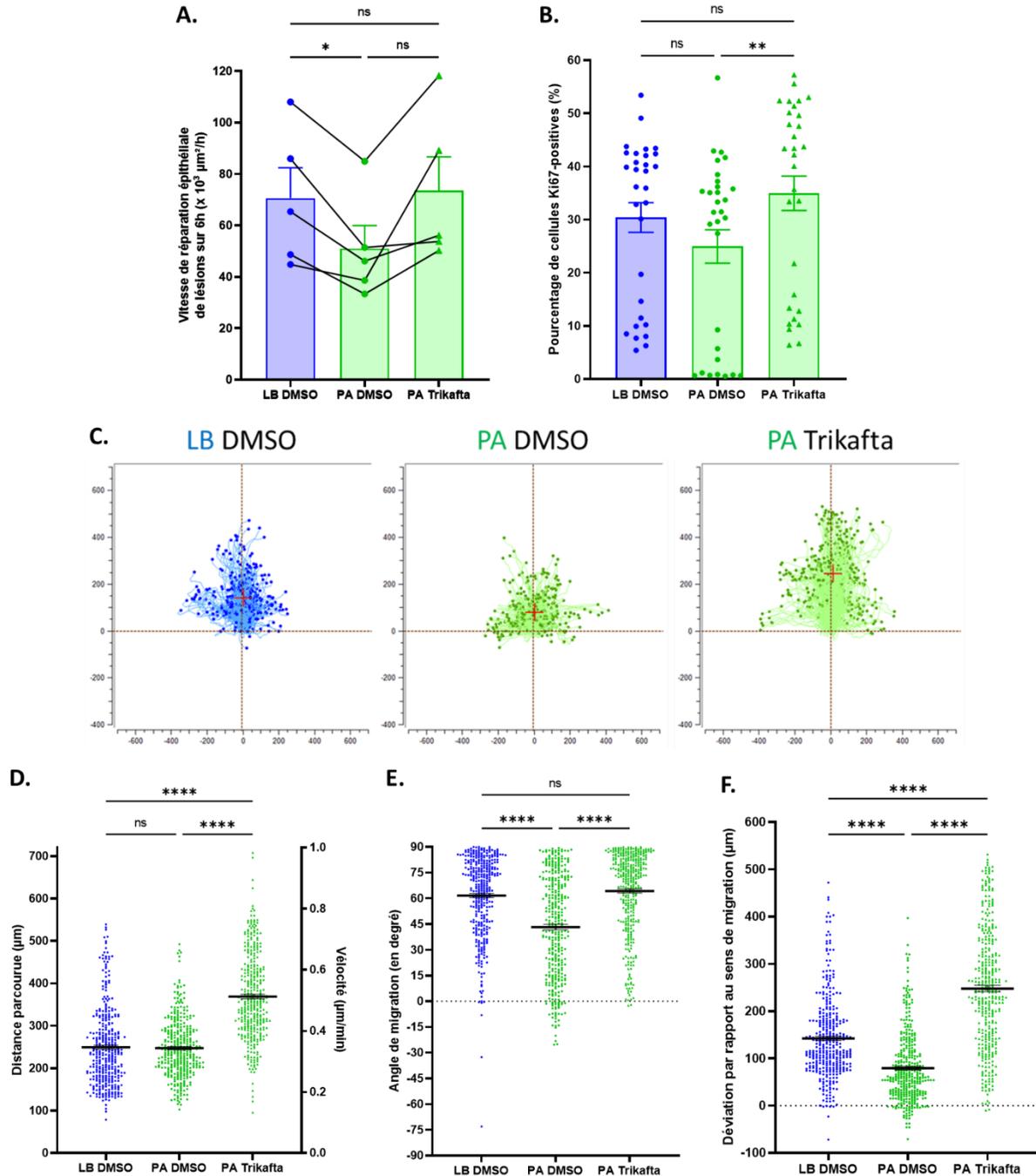
**Figure 16. – Effet de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur la migration guidée de cultures de cellules épithéliales bronchiques de patients FK F508del homozygotes en cours de réparation.**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires avec la combinaison Trikafta (2 µM VX-445, 3 µM VX-661, 0,1 µM VX-770) ou le véhicule DMSO (condition contrôle), les cultures primaires de cellules bronchiques de patients FK F508del/F508del ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau au Trikafta ou au DMSO. Les dynamiques de migration en bord de plaie (après 12 heures de réparation) ont été mesurées à partir des logiciels ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool. Photos représentatives du temps initial après lésion (Temps 0H), et des suivis unitaires après la période de migration (Temps 12H), de cellules bronchiques en condition contrôle (DMSO) (A) ou traitées au Trikafta (B), au grossissement 100X. C. Comparaison des trajectoires de migration des cellules (n = 3 patients; N = 360 cellules). Quantification de la distance et vitesse de migration (D) et de l'angle de migration (E) des cellules (n = 3 patients; N = 360 cellules; test Mann-Whitney).  $***P < 0,001$ ;  $****P < 0,0001$ .

Les patients FK présentent très fréquemment des infections bactériennes de leurs voies respiratoires, généralement à *P. aeruginosa* et/ou *S. aureus*. Les précédents travaux du laboratoire ont démontré que la présence des VirF de ces bactéries altère la réparation épithéliale, ainsi que l'efficacité des modulateurs de CFTR tel que l'Orkambi (147–150). Compte tenu de l'effet bénéfique observé du Trikafta sur la réparation épithéliale en condition non infectieuse, l'impact d'une exposition aux VirF de *P. aeruginosa* ou *S. aureus* a alors été examinée, d'abord en condition contrôle (DMSO), puis en présence de Trikafta.

Comme constaté à la figure 17, la condition infectieuse à *P. aeruginosa* affecte significativement la vitesse de réparation moyenne des lésions (Fig. 17A), ce paramètre étant diminué pour l'ensemble des cultures cellulaires des patients FK (n = 5). Similairement, la prolifération cellulaire est aussi inhibée (Fig. 17B). Concernant les dynamiques de migration cellulaire, les cellules présentent un profil de migration moins linéaire (Fig. 17C), mais migrent néanmoins presque aussi loin qu'en condition contrôle (Fig. 17D). Les VirF de *P. aeruginosa* semblent davantage affecter la directionnalité des cellules, comme en témoigne l'angle de migration significativement altéré (Fig. 17E), ainsi que la déviation plus prononcée des cellules par rapport au sens de migration propice à la réparation (Fig. 17F).

De façon encourageante, on constate qu'à l'ajout du Trikafta, la vitesse de réparation des lésions est améliorée dans l'ensemble des cultures cellulaires des patients (Fig. 17A). De façon significative, on observe également une hausse du nombre de cellules prolifératives (Fig. 17B) ainsi qu'une amélioration des dynamiques de migration cellulaire, en dépit de la présence des VirF de PA. En effet, le traitement au Trikafta permet d'améliorer la distance parcourue par les cellules, ainsi que leur angle de migration et leur déviation par rapport au sens de migration, et ce, de façon significative comparativement à la condition contrôle (Fig. 17D-F).



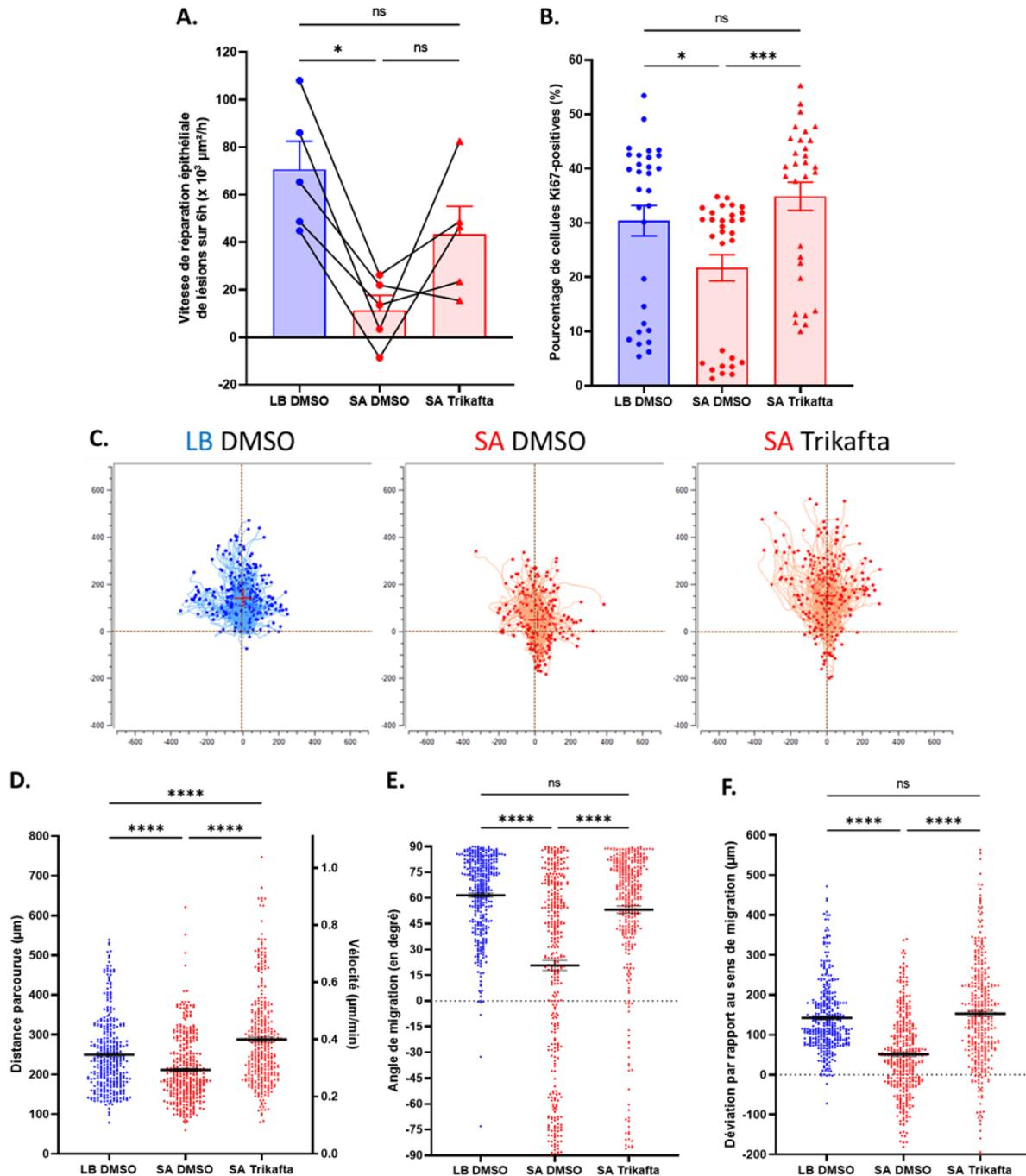
**Figure 17. – Effets de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK F508del homozygotes en présence des VirF de *P. aeruginosa*.**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires avec la combinaison Trikafta (2  $\mu\text{M}$  VX-445, 3  $\mu\text{M}$  VX-661, 0,1  $\mu\text{M}$  VX-770) ou le véhicule DMSO (condition contrôle), ainsi qu'aux VirF de *P. aeruginosa* (PA; vert) ou au milieu contrôle LB Lennox (LB; bleu), les cultures primaires de cellules bronchiques de patients FK F508del/F508del ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau aux mêmes conditions

respectives. Les vitesses de réparation ont été mesurées par le logiciel ImageJ, la prolifération par ICY, et les dynamiques de migration par ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool. **A.** Comparaison des vitesses de réparation des lésions épithéliales (n = 5 patients; tests RM one-way ANOVA et post hoc Šidák). **B.** Quantification de la prolifération cellulaire, selon le pourcentage de cellules Ki67-positives, normalisé par le nombre total de cellules marquées au DAPI (n = 3 patients; N = 30 images; tests Kruskal-Wallis et post hoc Dunn). **C.** Comparaison des trajectoires de migration des cellules (n = 3 patients; N = 360 cellules). Quantification de la distance et vitesse de migration (**D**), de l'angle de migration (**E**) et de la déviation par rapport au sens de migration (**F**) des cellules (n = 3 patients; N = 360 cellules; tests Kruskal-Wallis et post hoc Dunn). Chaque point (**C**, **D**, **E**, **F**) correspond à une cellule. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

Concernant maintenant l'impact des VirF de *S. aureus*, on constate qu'ils affectent fortement les paramètres de la réparation mesurés. En effet, la vitesse de réparation des lésions (Fig. 18A), la prolifération cellulaire (Fig. 18B) et les dynamiques de migration cellulaire (Fig. 18D-F) sont toutes significativement altérées. Cela se visualise par un grand nombre de cellules migrant an arrière du sens de réparation à cause de la condition infectieuse à *S. aureus* (Fig. 18C).

Cependant, l'ajout du Trikafta permet de stimuler les différents processus de la réparation, et ce, malgré la présence des VirF de *S. aureus*. En plus de la vitesse de réparation des lésions où une stimulation non significative est retrouvée dans la majorité des cultures des patients FK (Fig. 18A; n = 4 sur 5), la prolifération cellulaire (Fig. 18B), la distance de migration (Fig. 18D) et l'angle de migration (Fig. 18E) sont significativement améliorés, de même que la déviation par rapport au sens de migration, où davantage de cellules migrent dans le sens de la réparation (Fig. 18F). Les stimulations obtenues des processus de réparation par le Trikafta, en dépit de la condition infectieuse à *S. aureus*, sont bénéfiques au point d'atteindre des valeurs similaires ou supérieures aux valeurs contrôles (sans infection) pour la prolifération cellulaire, la déviation par rapport au sens de migration, et la distance de migration.



**Figure 18. – Effets de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK F508del homozygotes en présence des VirF de *S. aureus*.**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires avec la combinaison Trikafta (2  $\mu\text{M}$  VX-445, 3  $\mu\text{M}$  VX-661, 0,1  $\mu\text{M}$  VX-770) ou le véhicule DMSO (condition contrôle), ainsi qu'aux VirF de *S. aureus* (SA; rouge) ou au milieu contrôle LB Lennox (LB; bleu), les cultures primaires de cellules bronchiques de patients FK F508del/F508del ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau aux mêmes conditions

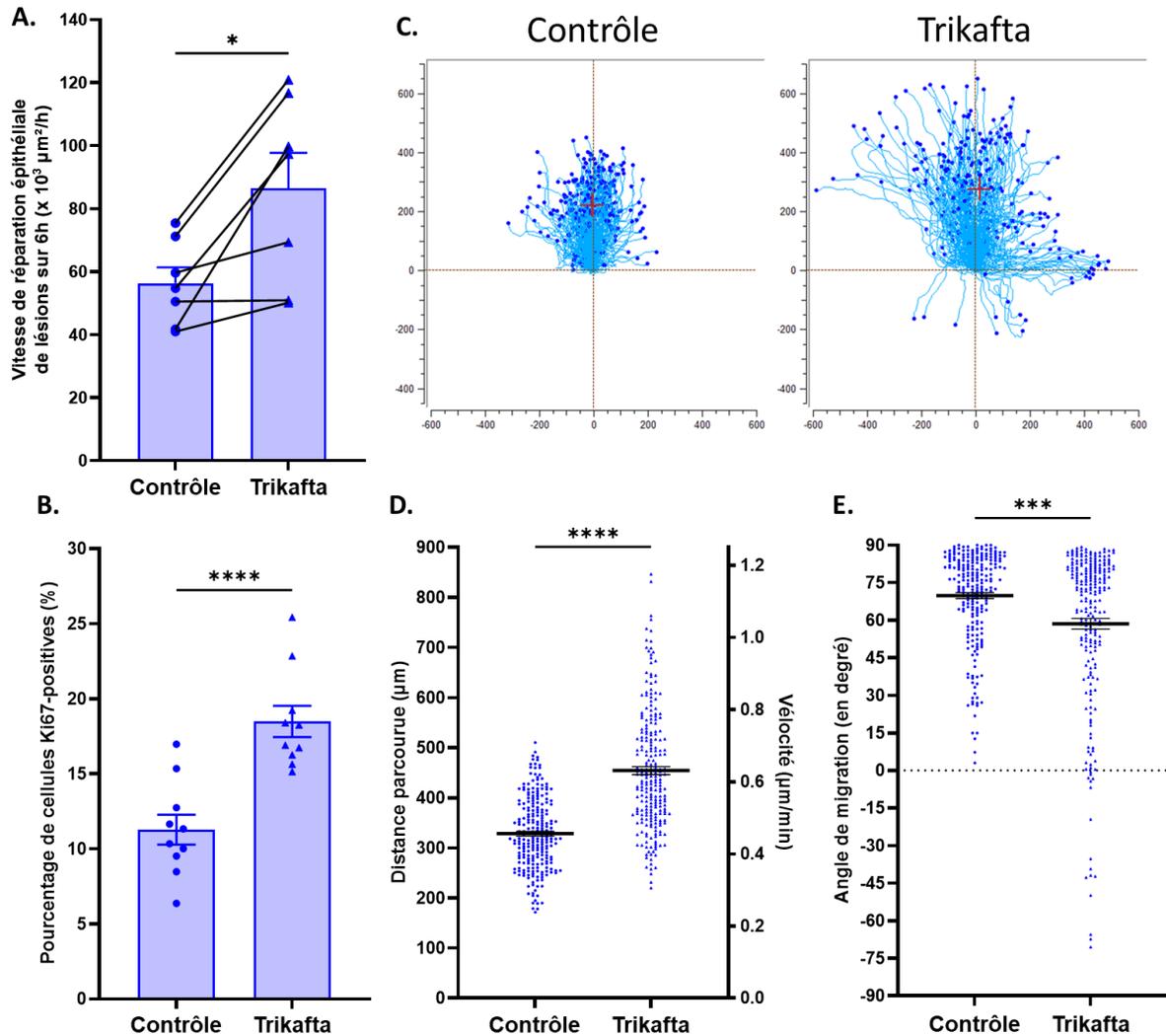
respectives. Les vitesses de réparation ont été mesurées par le logiciel ImageJ, la prolifération par ICY, et les dynamiques de migration par ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool. **A.** Comparaison des vitesses de réparation des lésions épithéliales (n = 5 patients; tests RM one-way ANOVA et post hoc Šidák). **B.** Quantification de la prolifération cellulaire, selon le pourcentage de cellules Ki67-positives normalisé par le nombre total de cellules marquées au DAPI (n = 3 patients; N = 30 images; tests Kruskal-Wallis et post hoc Dunn). **C.** Comparaison des trajectoires de migration des cellules (n = 3 patients; N = 360 cellules). Quantification de la distance et vitesse de migration (**D**), de l'angle de migration (**E**) et de la déviation par rapport au sens de migration (**F**) des cellules (n = 3 patients; N = 360 cellules; tests Kruskal-Wallis et post hoc Dunn). Chaque point (**C**, **D**, **E**, **F**) correspond à une cellule. \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

## 4.2 Effets de la combinaison Trikafta sur les processus de réparation de cultures primaires bronchiques de patients FK F508del hétérozygotes

L'efficacité du Trikafta sur la réparation épithéliale, malgré la condition infectieuse à *P. aeruginosa* ou *S. aureus*, dans des cultures de patients FK F508del homozygotes, nous a amené à nous demander si le traitement pouvait également être bénéfique dans des cultures bronchiques de patients FK hétérozygotes, éligibles au Trikafta.

Nous avons donc itéré l'analyse de l'efficacité du Trikafta dans des cultures de patients FK F508del hétérozygotes, portant une mutation F508del, et une autre mutation de classe I, soit 621+1G>T ou 711+1G>T. Ces mutations de fonction minimale menant à une absence de production de la protéine CFTR, le Trikafta va uniquement corriger la mutation F508del, son efficacité secondaire sur la réparation épithéliale pourrait alors être diminuée.

Comme observé précédemment (Figures 14-16), le Trikafta améliore aussi la majorité des paramètres de la réparation épithéliale dans des cultures de patients FK F508del hétérozygotes en condition non infectieuse. On constate en effet une augmentation statistiquement significative de la vitesse de réparation moyenne des lésions (Fig. 19A), cette hausse étant observée dans les cultures cellulaires de 6 patients sur les 7 testés. La prolifération cellulaire (Fig. 19B) et la distance de migration des cellules (Fig. 19D) sont également significativement augmentées grâce au traitement. L'angle de migration est cependant significativement altéré à l'ajout du Trikafta (Fig. 19E), comme le suggère le profil migratoire des cellules, migrant plus loin qu'en contrôle, mais de manière moins dirigée vers la lésion (Fig. 19C).



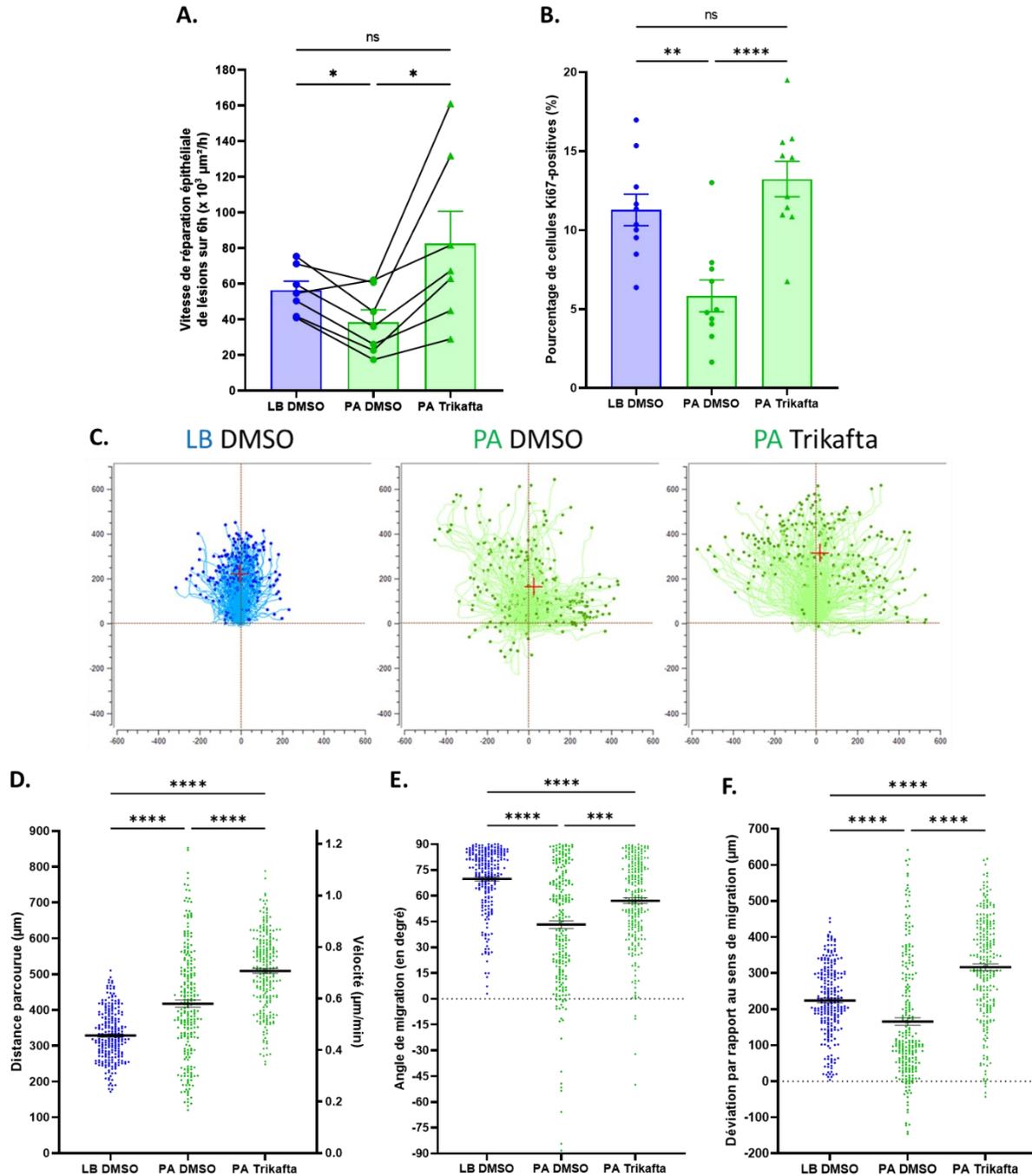
**Figure 19. – Effets de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I).**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires avec la combinaison Trikafta (2  $\mu\text{M}$  VX-445, 3  $\mu\text{M}$  VX-661, 0,1  $\mu\text{M}$  VX-770) ou le véhicule DMSO (condition contrôle), les cultures primaires de cellules bronchiques de patients FK F508del/621+1G>T et F508del/711+1G>T ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau au Trikafta ou au DMSO. Les vitesses de réparation ont été mesurées par le logiciel ImageJ, la prolifération par ICY, et les dynamiques de migration par ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool. **A.** Comparaison des vitesses de réparation des lésions épithéliales (n = 7 patients; test-t apparié). **B.** Quantification de la prolifération cellulaire, selon le pourcentage de cellules Ki67-positives normalisé par le nombre total de cellules marquées au DAPI (n = 1 patient; N = 10 images; test-t non-apparié). **C.** Comparaison des trajectoires de migration des cellules (n = 2 patients; N = 240 cellules; test Mann-Whitney). Quantification de la distance et vélocité de migration (**D**) et de l'angle de migration (**E**) des cellules (n = 2 patients; N = 240 cellules). Chaque point (**C**, **D**, **E**) correspond à une cellule. \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

Les infections communes des VA des patients FK aux bactéries *P. aeruginosa* et *S. aureus* nous a amené à examiner de nouveau l'impact de leurs VirF sur les processus de réparation, ainsi que sur l'efficacité du Trikafta au sein des cultures de patients FK hétérozygotes (F508del/mutation de classe I).

L'effet néfaste des VirF de *P. aeruginosa* sur les processus de réparation a été de nouveau confirmé au sein de ces cultures primaires. On constate effectivement que la condition infectieuse à *P. aeruginosa* inhibe significativement la vitesse de réparation des lésions (Fig. 20A), la prolifération cellulaire (Fig. 20B), l'angle de migration des cellules (Fig. 20E), et accentue leur déviation par rapport au sens de migration (Fig. 20F). Comme constaté précédemment (Fig. 17D), les VirF de *P. aeruginosa* ne diminuent cependant pas la distance de migration des cellules (Fig. 20D), l'effet de la virulence de *P. aeruginosa* se constate davantage dans la directionnalité des cellules en migration, comme en témoigne leur migration sur les côtés et en arrière de la lésion (Fig. 20C).

L'ajout du Trikafta permet cependant une amélioration statistiquement significative de l'ensemble des paramètres de réparation mesurés. En effet, on remarque que grâce au traitement, la vitesse de réparation des lésions (Fig. 20A), la prolifération cellulaire (Fig. 20B), la distance de migration (Fig. 20D), l'angle de migration (Fig. 20E) et la déviation par rapport au sens de migration (Fig. 20F) des cellules sont améliorés, et ce, malgré la présence des VirF de *P. aeruginosa*. Ces paramètres améliorés grâce au Trikafta vont même jusqu'à présenter des valeurs supérieures aux valeurs mesurées en condition contrôle non infectieuse, à l'exception de l'angle de migration.



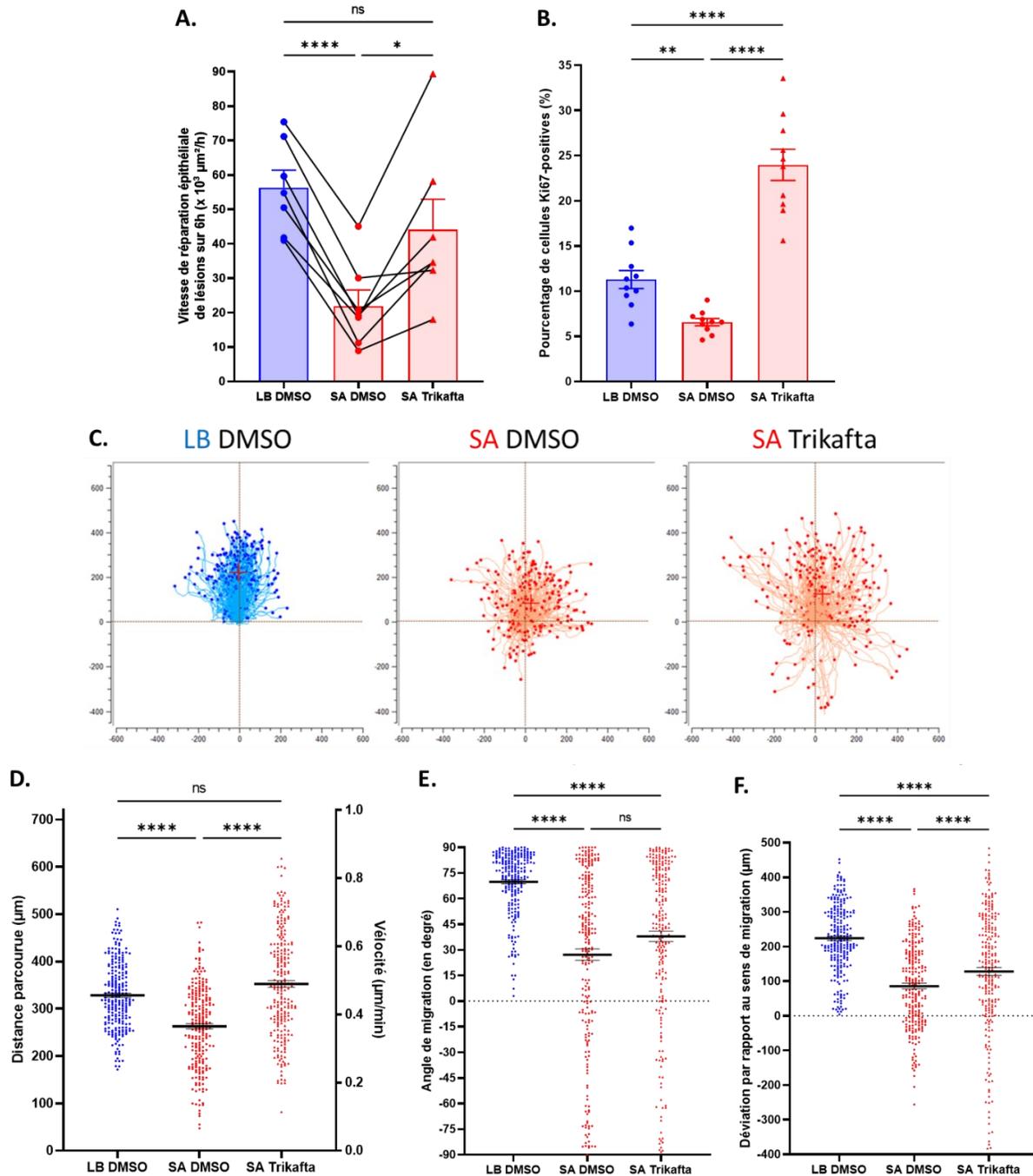
**Figure 20. – Effets de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I) en présence des VirF de *P. aeruginosa*.**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires avec la combinaison Trikafta (2  $\mu\text{M}$  VX-445, 3  $\mu\text{M}$  VX-661, 0,1  $\mu\text{M}$  VX-770) ou le véhicule DMSO (condition contrôle), ainsi qu'aux VirF de *P. aeruginosa* (PA; vert) ou au milieu contrôle LB Lennox (LB; bleu), les cultures primaires de cellules bronchiques de patients FK F508del/621+1G>T et F508del/711+1G>T ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau

aux mêmes conditions respectives. Les vitesses de réparation ont été mesurées par le logiciel ImageJ, la prolifération par ICY, et les dynamiques de migration par ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool. **A.** Comparaison des vitesses de réparation des lésions épithéliales (n = 7 patients; tests RM one-way ANOVA et post hoc Šidák). **B.** Quantification de la prolifération cellulaire, selon le pourcentage de cellules Ki67-positives normalisé par le nombre total de cellules marquées au DAPI (n = 1 patient; N = 10 images; tests Ordinary one-way ANOVA et post hoc Šidák). **C.** Comparaison des trajectoires de migration des cellules (n = 2 patients; N = 240 cellules). Quantification de la distance et vitesse de migration (**D**), de l'angle de migration (**E**) et de la déviation par rapport au sens de migration (**F**) des cellules (n = 2 patients; N = 240 cellules; tests Kruskal-Wallis et post hoc Dunn). Chaque point (**C**, **D**, **E**, **F**) correspond à une cellule. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

Concernant les VirF de *S. aureus*, leur présence inhibe également l'ensemble des paramètres de la réparation épithéliale mesurés. On constate en effet une diminution statistiquement significative de la vitesse de réparation des lésions (Fig. 21A), de la prolifération cellulaire (Fig. 21B) et des dynamiques de la migration cellulaire (Fig. 21D-F) dans les cultures de patients hétérozygotes (F508del/mutation de classe I).

L'exposition des cultures cellulaires au Trikafta permet cependant de stimuler l'ensemble de ces paramètres, et ce, en dépit de la condition infectieuse à *S. aureus*. En plus de l'amélioration de l'angle de migration observée (Fig. 21E), on remarque effectivement une augmentation significative de la vitesse de réparation des lésions (Fig. 21A), de la prolifération cellulaire (Fig. 21B), de la distance de migration (Fig. 21D) et une amélioration de la déviation par rapport au sens de migration (Fig. 21F) des cellules. Cet effet bénéfique du Trikafta ne permet toutefois pas d'améliorer la majorité des paramètres au-delà des valeurs mesurées en condition contrôle non infectieuse.



**Figure 21. – Effets de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I) en présence des VirF de *S. aureus*.**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires avec la combinaison Trikafta (2  $\mu\text{M}$  VX-445, 3  $\mu\text{M}$  VX-661, 0,1  $\mu\text{M}$  VX-770) ou le véhicule DMSO (condition contrôle), ainsi qu'aux VirF de *S. aureus* (SA; rouge) ou au milieu contrôle LB Lennox (LB; bleu), les cultures primaires de cellules bronchiques de patients FK F508del/621+1G>T et F508del/711+1G>T ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau aux

mêmes conditions respectives. Les vitesses de réparation ont été mesurées par le logiciel ImageJ, la prolifération par ICY, et les dynamiques de migration par ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool. **A.** Comparaison des vitesses de réparation des lésions épithéliales (n = 7 patients; tests RM one-way ANOVA et post hoc Šidák). **B.** Quantification de la prolifération cellulaire, selon le pourcentage de cellules Ki67-positives normalisé par le nombre total de cellules marquées au DAPI (n = 1 patient; N = 10 images; tests Ordinary one-way ANOVA et post hoc Šidák). **C.** Comparaison des trajectoires de migration des cellules (n = 2 patients; N = 240 cellules). Quantification de la distance et vélocité de migration (**D**), de l'angle de migration (**E**) et de la déviation par rapport au sens de migration (**F**) des cellules (n = 2 patients; N = 240 cellules; tests Kruskal-Wallis et post hoc Dunn). Chaque point (**C**, **D**, **E**, **F**) correspond à une cellule. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

L'ensemble de ces données démontre ainsi que le Trikafta stimule la réparation des lésions, la prolifération et la migration cellulaire, et ce, malgré la présence de VirF des bactéries communes en FK, *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Toutefois, certains de ces paramètres n'atteignent pas les niveaux observés en absence d'infection.

### **4.3 Effets du ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires bronchiques de patients FK F508del hétérozygotes**

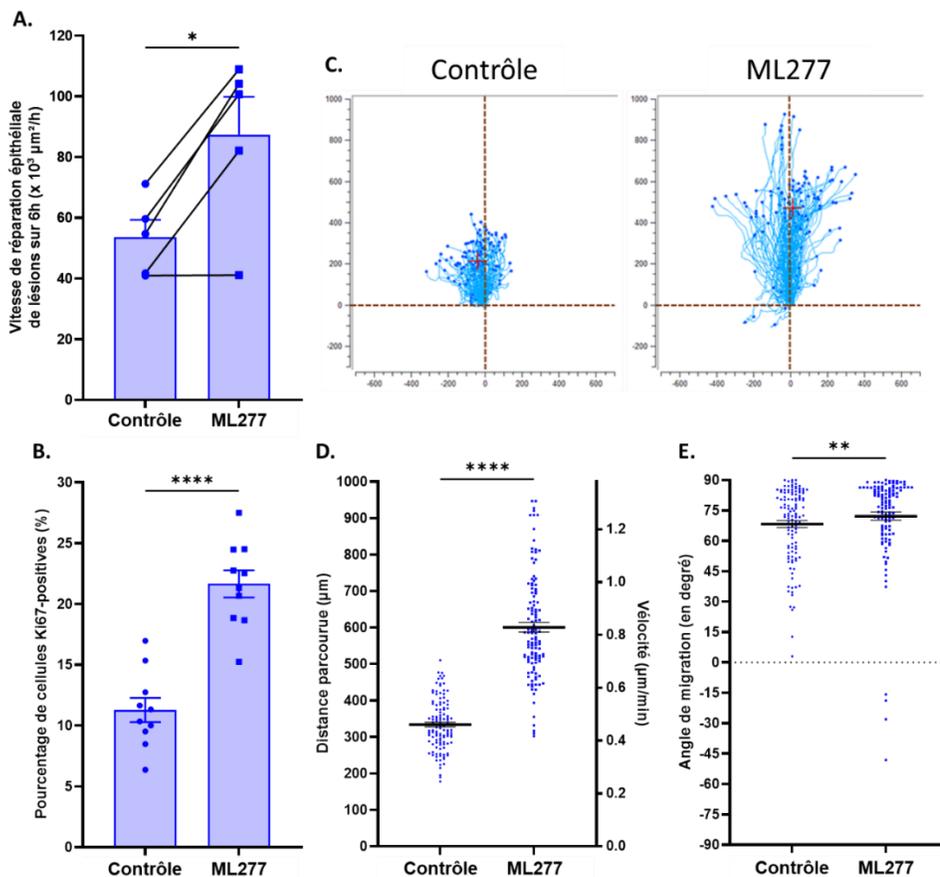
Les résultats des études cliniques démontrent que les patients éligibles au Trikafta peuvent présenter une réponse à ce traitement d'efficacité variable ou défavorable selon les différents effets secondaires possibles (201–207). D'autres alternatives thérapeutiques doivent alors être envisagées.

Compte tenu de l'implication démontrée des canaux potassiques dans les mécanismes de prolifération et migration cellulaires et pour les processus de réparation épithéliale dans divers modèles cellulaires (17), nous avons alors voulu tester l'hypothèse que des activateurs de ces canaux puissent stimuler la réparation de cultures primaires bronchiques. Cette stratégie s'étendrait en outre à un plus grand nombre de patients, contrairement aux modulateurs de CFTR qui dépendent de la classe de mutations. Basé sur les données précédentes du laboratoire (28–30), indiquant un rôle du canal KvLQT1, notre intérêt s'est alors porté sur le ML277, activateur de ce canal potassique (219).

Afin de se positionner quant à son effet sur les différents paramètres de la réparation épithéliale mesurés, le potentiel effet bénéfique du ML277 a d'abord été examiné en condition non

infectieuse, puis en présence des VirF de *P. aeruginosa* ou *S. aureus*. Nous nous sommes à nouveau intéressés à des patients FK hétérozygotes, arborant la mutation F508del, ainsi que 621+1G>T ou 711+1G>T, deux mutations de classe I avec fonction minimale.

En condition non infectieuse, le ML277 permet une stimulation statistiquement significative de l'ensemble des paramètres de la réparation épithéliale mesurés. En effet, en présence de la molécule, la vitesse de réparation des lésions est améliorée dans la majorité des cultures des patients (Fig. 22A; n = 4 sur 5), les valeurs de prolifération cellulaire et de distance de migration sont doublées (Fig. 22B, 22D), le profil migratoire des cellules démontre une migration cellulaire plus efficace (Fig. 22C), et l'angle de migration est amélioré de plusieurs degrés (Fig. 22E).



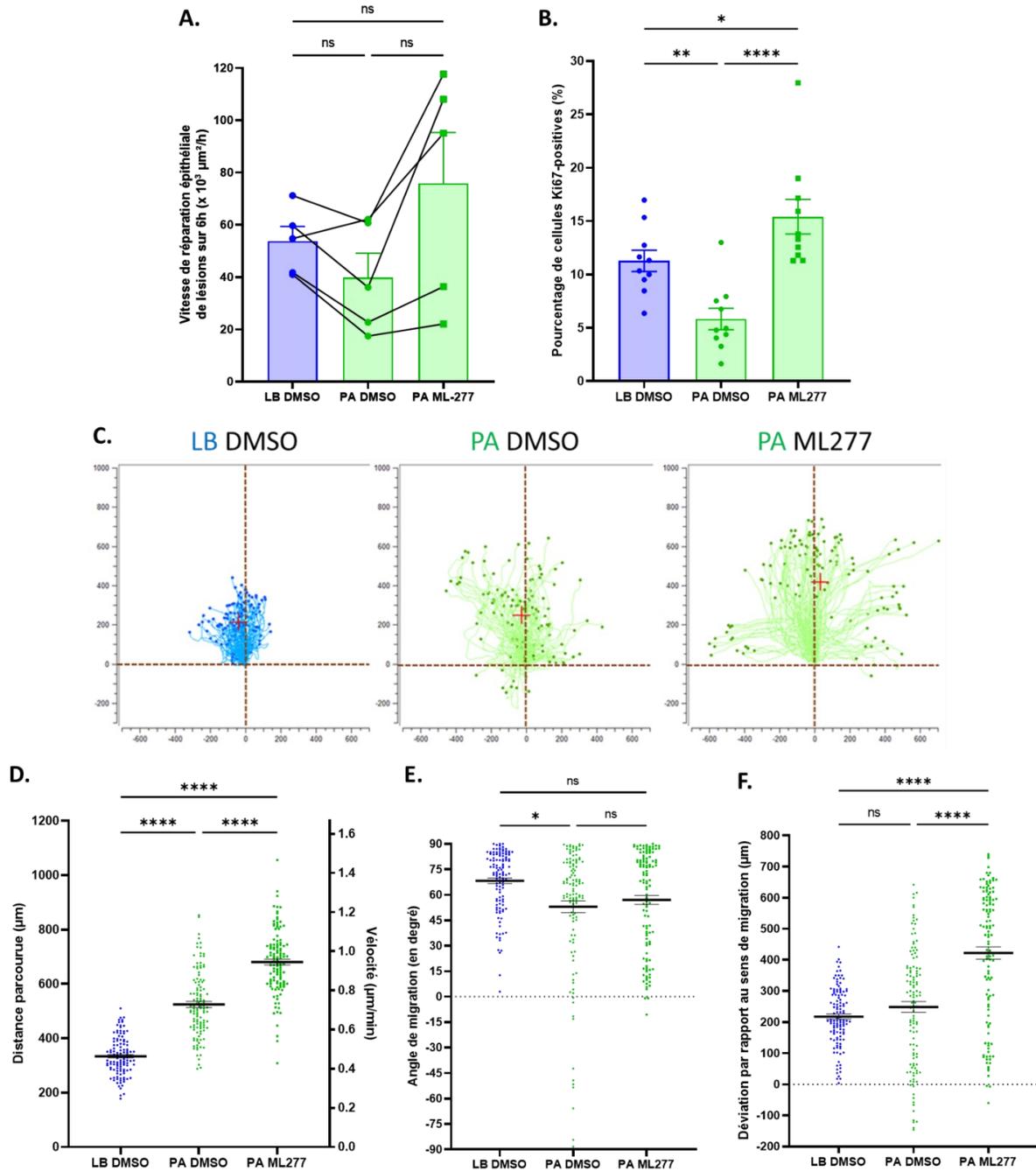
**Figure 22. – Effets de l'activateur de KvLQT1 ML277, sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I).**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires au ML277 (4  $\mu\text{M}$ ) ou au véhicule DMSO (condition contrôle), les cultures primaires de cellules bronchiques de patients FK F508del/621+1G>T et

F508del/711+1G>T ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau au Trikafta ou au DMSO. Les vitesses de réparation ont été mesurées par le logiciel ImageJ, la prolifération par ICY, et les dynamiques de migration par ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool. **A.** Comparaison des vitesses de réparation des lésions épithéliales (n = 5 patients; test-t apparié). **B.** Quantification de la prolifération cellulaire, selon le pourcentage de cellules Ki67-positives normalisé par le nombre total de cellules marquées au DAPI (n = 1 patient; N = 10 images; test-t non-apparié). **C.** Comparaison des trajectoires de migration des cellules (n = 1 patient; N = 120 cellules). Quantification de la distance et vélocité de migration (**D**) et de l'angle de migration (**E**) des cellules (n = 1 patient; N = 120 cellules; test Mann-Whitney). Chaque point (**C**, **D**, **E**) correspond à une cellule. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

Maintenant, en présence des VirF de *P. aeruginosa*, l'ajout de l'activateur de canaux KvLQT1 ML277 permet néanmoins de stimuler l'ensemble des paramètres de la réparation épithéliale étudiés. Outre l'augmentation de la vitesse de réparation des lésions (Fig. 23A) et celle plus faible de l'angle de migration (Fig. 23E), on note effectivement une amélioration statistiquement significative de la prolifération cellulaire (Fig. 23B), de la distance de migration (Fig. 23D) et de la déviation par rapport au sens de migration (Fig. 23F) des cellules grâce au ML277, et ce, en dépit de la condition infectieuse à PA.

L'effet du ML277 semble également bénéfique au point d'améliorer, malgré la présence des VirF de *P. aeruginosa*, la majorité de paramètres de la réparation mesurés au-delà des valeurs observées en condition contrôle, à l'exception de l'angle de migration des cellules qui n'est que légèrement stimulé par la molécule.

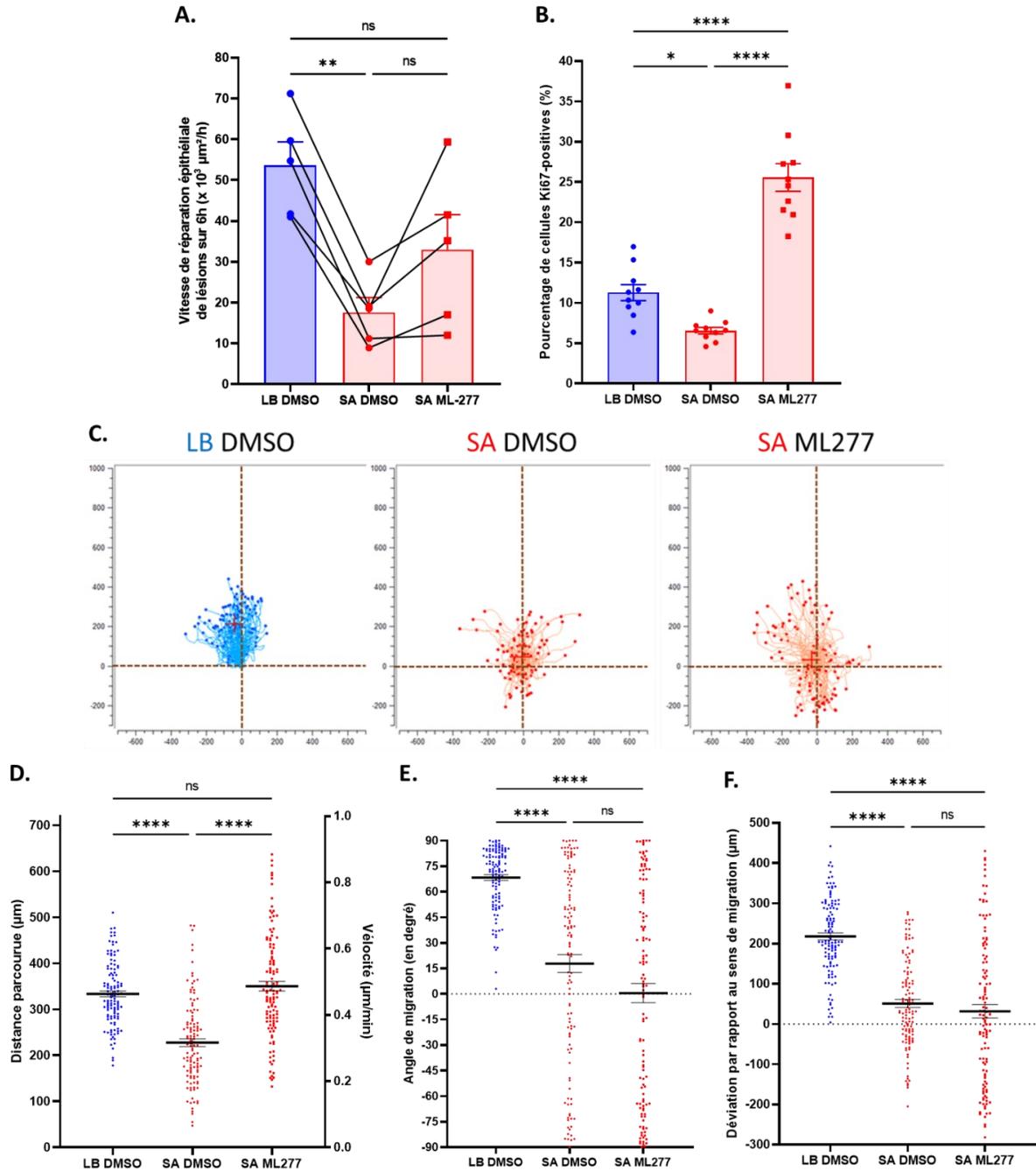


**Figure 23. – Effets de l’activateur de KvLQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I) en présence des VirF de *P. aeruginosa*.**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires au ML277 (4 μM) ou au véhicule DMSO (condition contrôle), ainsi qu’aux VirF de *P. aeruginosa* (PA; vert) ou au milieu contrôle LB Lennox (LB; bleu), les cultures primaires de cellules bronchiques de patients FK F508del/621+1G>T et F508del/711+1G>T ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau aux mêmes conditions respectives. Les vitesses de réparation ont été mesurées par le logiciel ImageJ, la prolifération par ICY, et les dynamiques de migration

par ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool. **A.** Comparaison des vitesses de réparation des lésions épithéliales (n = 5 patients, tests RM one-way ANOVA et post hoc Šidák). **B.** Quantification de la prolifération cellulaire, selon le pourcentage de cellules Ki67-positives normalisé par le nombre total de cellules marquées au DAPI (n = 1 patient; N = 10 images, tests Ordinary one-way ANOVA et post hoc Šidák). **C.** Comparaison des trajectoires de migration des cellules (n = 1 patient; N = 120 cellules). Quantification de la distance et vélocité de migration (**D**), de l'angle de migration (**E**) et de la déviation par rapport au sens de migration (**F**) des cellules (n = 1 patient; N = 120 cellules, tests Kruskal-Wallis et post hoc Dunn). Chaque point (**C**, **D**, **E**, **F**) correspond à une cellule. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

En présence, cette fois-ci, des VirF de *S. aureus* qui inhibent les processus de réparation des cultures cellulaires de patients FK hétérozygotes, comme préalablement constaté (Figure 21), l'activateur ML277 permet toutefois d'améliorer la vitesse de réparation des lésions (Fig. 24A) et, de façon significative, la prolifération cellulaire (Fig. 24B) et la distance de migration (Fig. 24D). Le rôle du ML277 dans la directionnalité des cellules en condition infectieuse ne semble cependant pas concluant, comme en témoigne l'angle de migration (Fig. 24E) et la déviation par rapport au sens de migration (Fig. 24F) des cellules, ce qui se visualise par la forte dispersion cellulaire au cours de la migration (Fig. 24C). De plus, le ML277 n'améliore significativement que la prolifération cellulaire au-delà des valeurs en condition contrôle.



**Figure 24. – Effets de l’activateur de KvLQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I) en présence des VirF de *S. aureus*.**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires au ML277 (4  $\mu\text{M}$ ) ou au véhicule DMSO (condition contrôle), ainsi qu’aux VirF de *S. aureus* (SA; rouge) ou au milieu contrôle LB Lennox (LB; bleu), les cultures primaires de cellules bronchiques de patients FK F508del/621+1G>T et F508del/711+1G>T ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau aux mêmes conditions respectives. Les vitesses de réparation ont été mesurées par le logiciel ImageJ, la prolifération par ICY, et les dynamiques de migration par ImageJ

et Chemotaxis and Migration Tool. **A.** Comparaison des vitesses de réparation des lésions épithéliales (n = 5 patients, tests RM one-way ANOVA et post hoc Šidák). **B.** Quantification de la prolifération cellulaire, selon le pourcentage de cellules Ki67-positives normalisé par le nombre total de cellules marquées au DAPI (n = 1 patient; N = 10 images, tests Ordinary one-way ANOVA et post hoc Šidák). **C.** Comparaison des trajectoires de migration des cellules (n = 1 patient; N = 120 cellules). Quantification de la distance et vélocité de migration (**D**), de l'angle de migration (**E**) et de la déviation par rapport au sens de migration (**F**) des cellules (n = 1 patient; N = 120 cellules, tests Kruskal-Wallis et post hoc Dunn). Chaque point (**C**, **D**, **E**, **F**) correspond à une cellule. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

La stimulation des processus de réparation obtenue grâce à l'activateur de KvLQT1 ML277 semble donc prometteuse, mais partielle. Bien que la molécule stimule efficacement la vitesse de réparation des lésions, la prolifération et les dynamiques de migration cellulaire en condition non infectieuse, la présence des VirF de *P. aeruginosa* ou *S. aureus* altère en partie cette efficacité. Plus particulièrement, le ML277 ne permet pas une amélioration de la directionnalité des cellules.

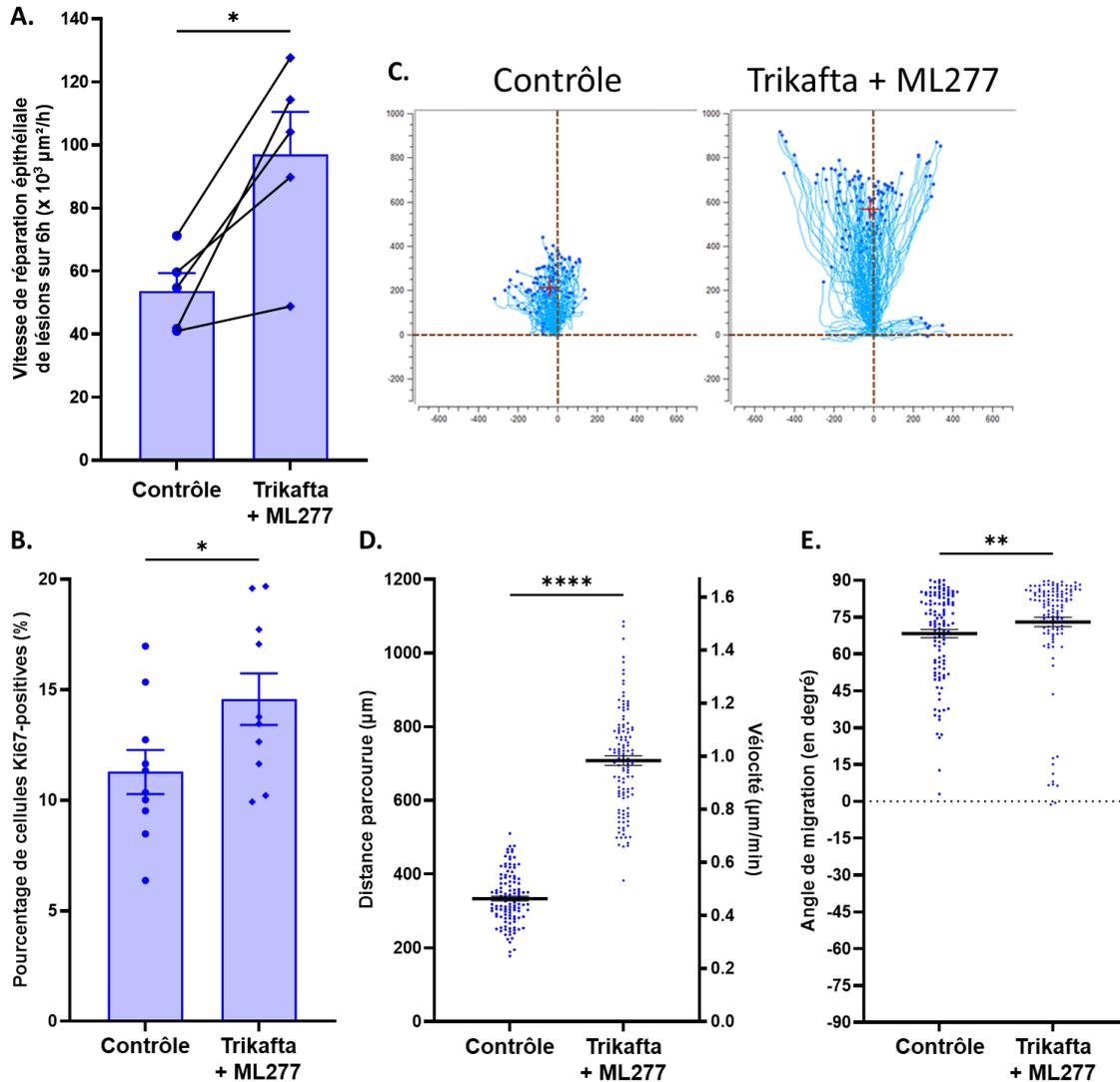
Nous avons alors postulé qu'une stratégie combinatoire, associant la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta avec l'activateur de KvLQT1 ML277, pourrait représenter une avenue intéressante.

#### **4.4 Effets de la combinaison du Trikafta et du ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires bronchiques de patients FK hétérozygotes F508del/classe I**

Nous avons alors voulu évaluer cette nouvelle alternative afin de possiblement combiner les effets bénéfiques de chacun des deux modulateurs de canaux ioniques (Trikafta et ML277) sur des cultures de patients FK hétérozygotes, portant les mutations F508del/621+1G>T ou F508del/711+1G>T, compte tenu des preuves respectives d'efficacité du Trikafta et du ML277 précédemment vérifiées dans les cultures cellulaires de ces mêmes patients.

En absence de VirF bactériens, la combinaison du Trikafta et du ML277 permet une amélioration statistiquement significative de la vitesse de réparation des lésions (Fig. 25A), de la prolifération cellulaire (Fig. 25B), de la distance de migration (Fig. 25D) et de l'angle de migration (Fig. 25E) des cellules. Comme en témoigne également le profil migratoire (Fig. 25C) où les cellules se déplacent

à la plus grande distance observée, tous traitements confondus. Cette stratégie combinatoire semble donc encourageante afin de promouvoir les processus de la réparation épithéliale.



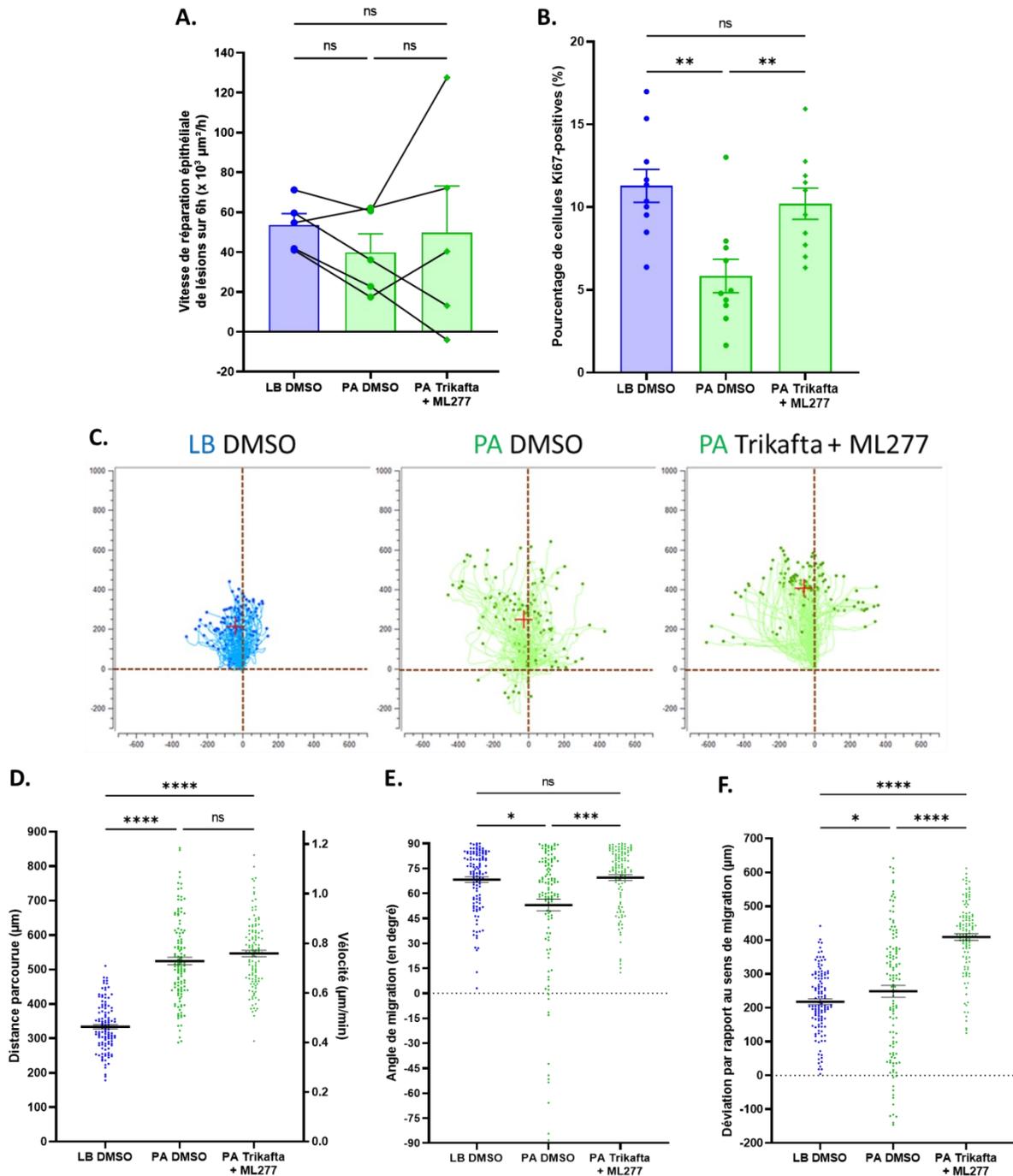
**Figure 25. – Effets de l'association de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta et de l'activateur de KvLQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I).**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires à la combinaison du Trikafta (2 μM VX-445, 3 μM VX-661, 0,1 μM VX-770) et du ML277 (4 μM), ou au véhicule DMSO (condition contrôle), les cultures primaires de cellules bronchiques de patients FK F508del/621+1G>T et F508del/711+1G>T ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau à la combinaison ou au DMSO. Les vitesses de réparation ont été mesurées par le logiciel ImageJ, la prolifération par ICY, et les dynamiques de migration par ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool. **A.** Comparaison des vitesses de réparation des lésions épithéliales (n = 5 patients; test-t apparié). **B.** Quantification de la prolifération cellulaire, selon le pourcentage de cellules Ki67-positives normalisé par le nombre total de cellules marquées au DAPI (n = 1 patient; N = 10 images;

test-t non-apparié). **C.** Comparaison des trajectoires de migration des cellules (n = 1 patient; N = 120 cellules). Quantification de la distance et vélocité de migration (**D**) et de l'angle de migration (**E**) des cellules (n = 1 patient; N = 120 cellules; test Mann-Whitney). Chaque point (**C**, **D**, **E**) correspond à une cellule. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

En présence des VirF de *P. aeruginosa*, la combinaison du Trikafta et du ML277 permet une stimulation partielle des processus de réparation. En effet, on note en premier lieu une légère amélioration de la vitesse de réparation des lésions (Fig. 26A), malgré l'hétérogénéité dans la réponse aux traitements entre les cultures de patients testés (n = 3 sur 5). De façon significative, on constate également une amélioration de la prolifération cellulaire (Fig. 26B), de l'angle de migration (Fig. 26E) et de la déviation par rapport au sens de migration (Fig. 26F) des cellules. Quant à la distance de migration, elle n'est que faiblement stimulée grâce à la combinaison en condition infectieuse à *P. aeruginosa*, comparativement à la condition infectieuse seule (Fig. 26D). Il faut noter toutefois que ces expérimentations n'ont été réalisées que sur une culture cellulaire (d'un patient).

Dans l'ensemble, aucun effet additif significatif du Trikafta et ML277 combinés ne semble être observé, comparativement aux effets du Trikafta et du ML277 seuls sur les processus de réparation (Figures 20 et 23).



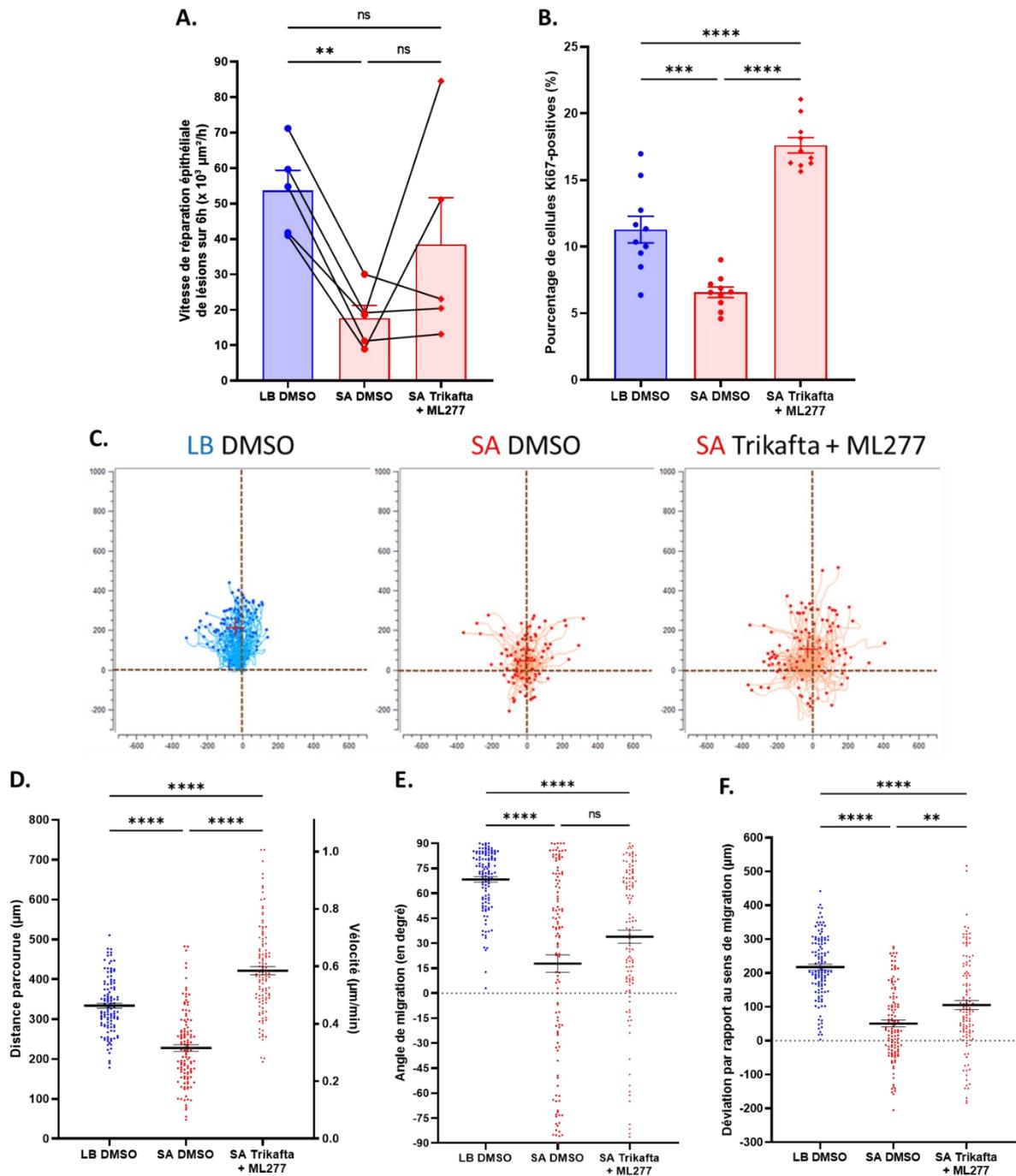
**Figure 26. – Effets de l’association de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta et de l’activateur de KvLQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I) en présence des VirF de *P. aeruginosa*.**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires à la combinaison du Trikafta (2  $\mu\text{M}$  VX-445, 3  $\mu\text{M}$  VX-661, 0,1  $\mu\text{M}$  VX-770) et du ML277 (4  $\mu\text{M}$ ), ou au véhicule DMSO (condition contrôle), ainsi qu’aux VirF de *P. aeruginosa* (PA; vert) ou au milieu contrôle LB Lennox (LB; bleu), les cultures primaires de cellules

bronchiques de patients FK F508del/621+1G>T et F508del/711+1G>T ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau aux mêmes conditions respectives. Les vitesses de réparation ont été mesurées par le logiciel ImageJ, la prolifération par ICY, et les dynamiques de migration par ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool. **A.** Comparaison des vitesses de réparation des lésions épithéliales (n = 5 patients; tests RM one-way ANOVA et post hoc Šidák). **B.** Quantification de la prolifération cellulaire, selon le pourcentage de cellules Ki67-positives normalisé par le nombre total de cellules marquées au DAPI (n = 1 patient; N = 10 images; tests Ordinary one-way ANOVA et post hoc Šidák). **C.** Comparaison des trajectoires de migration des cellules (n = 1 patient; N = 120 cellules). Quantification de la distance et vélocité de migration (**D**), de l'angle de migration (**E**) et de la déviation par rapport au sens de migration (**F**) des cellules (n = 1 patient; N = 120 cellules; tests Kruskal-Wallis et post hoc Dunn). Chaque point (**C**, **D**, **E**, **F**) correspond à une cellule. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

La combinaison du Trikafta et du ML277 permet également de stimuler l'ensemble des paramètres de réparation en présence de VirF de *S. aureus*. En effet, on observe une augmentation de la vitesse de réparation des lésions (Fig. 27A), bien que la réponse observée soit hétérogène entre les cultures de patients testés. On constate également, à partir d'un n = 1 patient, une amélioration statistiquement significative de la prolifération (Fig. 27B), de la distance de migration (Fig. 27D) et de la déviation par rapport au sens de migration (Fig. 27F) des cellules à l'ajout de la combinaison, en dépit de la condition infectieuse à *S. aureus*. L'angle de migration n'est cependant que légèrement amélioré (Fig. 27E).

Malgré la présence des VirF de *S. aureus*, l'effet de la combinaison du Trikafta et du ML277 semble bénéfique au point d'améliorer significativement la prolifération et la distance de migration au-delà des valeurs mesurées en condition contrôle non infectieuse. Dans l'ensemble, les stimulations obtenues pour la double combinaison ne semblent cependant pas procurer d'effet additif dans les processus de réparation, comparativement à leur effet lorsque seuls (Figures 21 et 24).



**Figure 27. – Effets de l’association de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta et de l’activateur de KvLQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de patients FK hétérozygotes (F508del/classe I) en présence des VirF de *S. aureus*.**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires à la combinaison du Trikafta (2 μM VX-445, 3 μM VX-661, 0,1 μM VX-770) et du ML277 (4 μM), ou au véhicule DMSO (condition contrôle), ainsi qu’aux VirF de *S. aureus* (SA; rouge) ou au milieu contrôle LB Lennox (LB; bleu), les cultures primaires de cellules

bronchiques de patients FK F508del/621+1G>T et F508del/711+1G>T ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau aux mêmes conditions respectives. Les vitesses de réparation ont été mesurées par le logiciel ImageJ, la prolifération par ICY, et les dynamiques de migration par ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool. **A.** Comparaison des vitesses de réparation des lésions épithéliales (n = 5 patients; tests RM one-way ANOVA et post hoc Šidák). **B.** Quantification de la prolifération cellulaire, selon le pourcentage de cellules Ki67-positives normalisé par le nombre total de cellules marquées au DAPI (n = 1 patient; N = 10 images; tests Ordinary one-way ANOVA et post hoc Šidák). **C.** Comparaison des trajectoires de migration des cellules (n = 1 patient; N = 120 cellules). Quantification de la distance et vélocité de migration (**D**), de l'angle de migration (**E**) et de la déviation par rapport au sens de migration (**F**) des cellules (n = 1 patient; N = 120 cellules; tests Kruskal-Wallis et post hoc Dunn). Chaque point (**C**, **D**, **E**, **F**) correspond à une cellule. \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

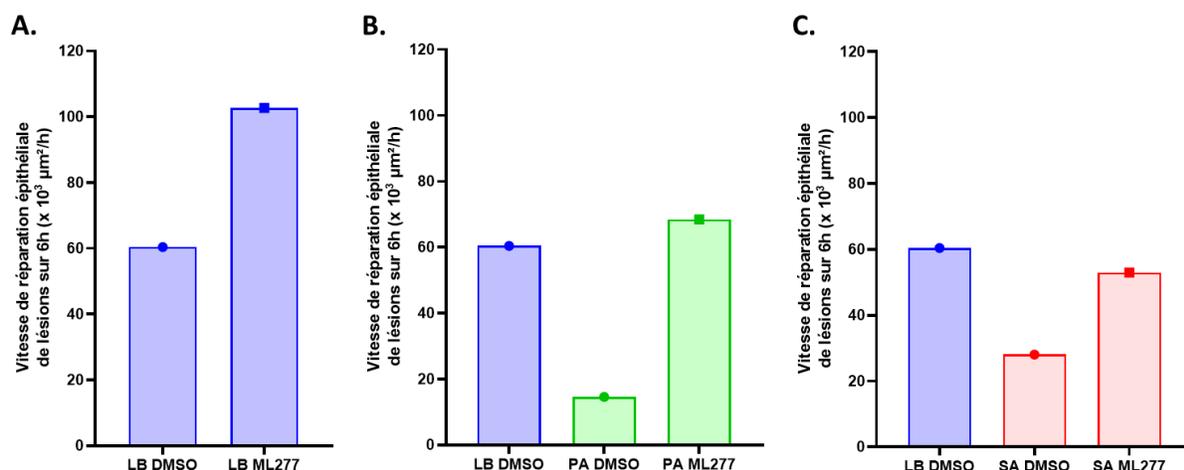
La combinaison du Trikafta et du ML277 semble donc améliorer l'ensemble des processus de réparation épithéliale mesurés, en condition non infectieuse comme infectieuse à *P. aeruginosa* ou *S. aureus*. Cette efficacité ne semble cependant pas additive, mais au mieux comparable aux effets du Trikafta ou du ML277 seuls. Ces résultats manquent toutefois de puissance avant qu'on ne puisse définitivement se prononcer quant à une absence d'effet synergique de cette combinaison.

## **4.5 Effets du ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires bronchiques d'un patient FK inéligible au Trikafta**

Aucun traitement ne permet actuellement de contrer l'absence de synthèse de protéine consécutive aux mutations de classe I. Les patients dont les deux allèles portent des mutations de classe I ne sont donc éligibles à aucun traitement et de nouvelles stratégies thérapeutiques doivent être développées (224). L'efficacité précédemment déterminée de l'activateur de KvLQT1 ML277 dans les cultures cellulaires de patients FK hétérozygotes F508del/classe I nous a amené à nous interroger sur sa possible efficacité de cet activateur afin d'améliorer la réparation épithéliale de cultures de patients FK non éligibles aux traitements ciblant CFTR.

Nous avons commencé à investiguer cette piste en évaluant la vitesse de réparation de lésions épithéliales des cultures cellulaires d'un patient FK portant les deux mutations de classe I 711+1G>T et G542X, et ce, en condition non infectieuse ainsi qu'infectieuse à *P. aeruginosa* ou *S. aureus*. On constate en condition non infectieuse que les cultures cellulaires de ce patient présentent une réponse encourageante à l'activateur ML277 avec une forte amélioration de la

vitesse de réparation (Fig. 28A). De plus, malgré la présence des VirF de *P. aeruginosa* ou *S. aureus*, qui inhibent ce paramètre, le ML277 permet d'accélérer la fermeture des lésions, au point d'atteindre une vitesse semblable à la valeur contrôle (Fig. 28B-C).



**Figure 28. – Effets de l’activateur de KvLQT1 ML277 sur la fermeture de lésions dans des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques d’un patient FK porteur de mutations de classe I, en présence ou non des VirF de *P. aeruginosa* ou *S. aureus*.**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires au ML277 (4 μM) ou au véhicule DMSO (condition contrôle), ainsi que respectivement aux VirF de *P. aeruginosa* (PA; vert) ou *S. aureus* (SA; rouge), ou au milieu contrôle LB Lennox (LB; bleu), les cultures primaires de cellules bronchiques d’un patient FK 711+1G>T/G542X ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau aux mêmes conditions respectives. La fermeture des lésions (après 6 heures de réparation) a été mesurée à partir du logiciel ImageJ. L’effet du ML277 sur la vitesse de réparation a été évalué en condition non infectieuse (A), et en condition infectieuse à *P. aeruginosa* (B) ou *S. aureus* (C) (n = 1 patient).

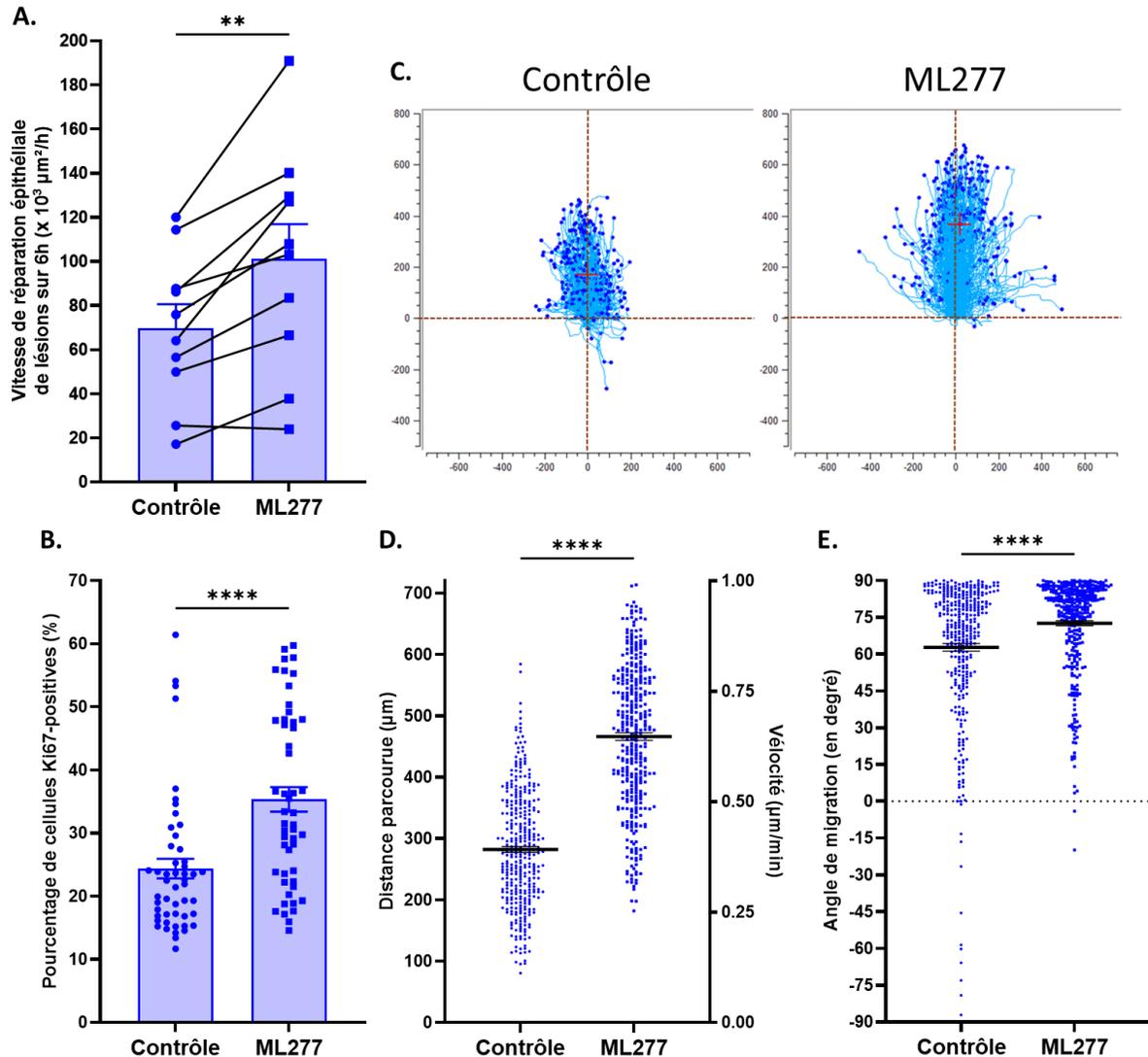
Il nous restera à investiguer les autres paramètres de la réparation épithéliale, tel que la prolifération cellulaire et les dynamiques de migration cellulaire.

Ce premier résultat prometteur nous encourage néanmoins à poursuivre ces expériences afin d’examiner le potentiel de cette stratégie thérapeutique alternative ciblant les canaux K<sup>+</sup>, afin de favoriser la restauration de l’intégrité épithéliale pour l’ensemble des personnes souffrant de la FK, quelles que soient leurs mutations génétiques.

## 4.6 Effets du ML277 sur la réparation de cultures primaires bronchiques de donneurs sains

Les infections bactériennes à *P. aeruginosa* et *S. aureus* ne se limitent pas aux patients FK. La prépondérance de ces infections est également commune chez les personnes non atteintes de la maladie (225,226), entraînant chez elles aussi des dommages épithéliaux et une morbidité accrue (136,227). Compte tenu de l'efficacité précédemment observée du ML277 sur les processus de réparation épithéliale, cet activateur des canaux KvLQT1 pourrait représenter une stratégie intéressante pour les personnes atteintes d'infections bactériennes à *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

Avant d'examiner l'efficacité du ML277 sur les paramètres de réparation étudiés en présence des VirF bactériens, nous avons préalablement vérifié son efficacité en condition non infectieuse. De même qu'au sein des cultures cellulaires de patients FK (Figure 22), on constate que le ML277 permet une amélioration statistiquement significative de l'ensemble des paramètres de réparation. En effet, malgré l'hétérogénéité observée dans les valeurs de réparation entre les cultures de donneurs sains, la vitesse de réparation des lésions (Fig. 29A), la prolifération cellulaire (Fig. 29B), la distance de migration (Fig. 29D) et l'angle de migration (Fig. 29E) des cellules sont améliorés grâce au ML277.

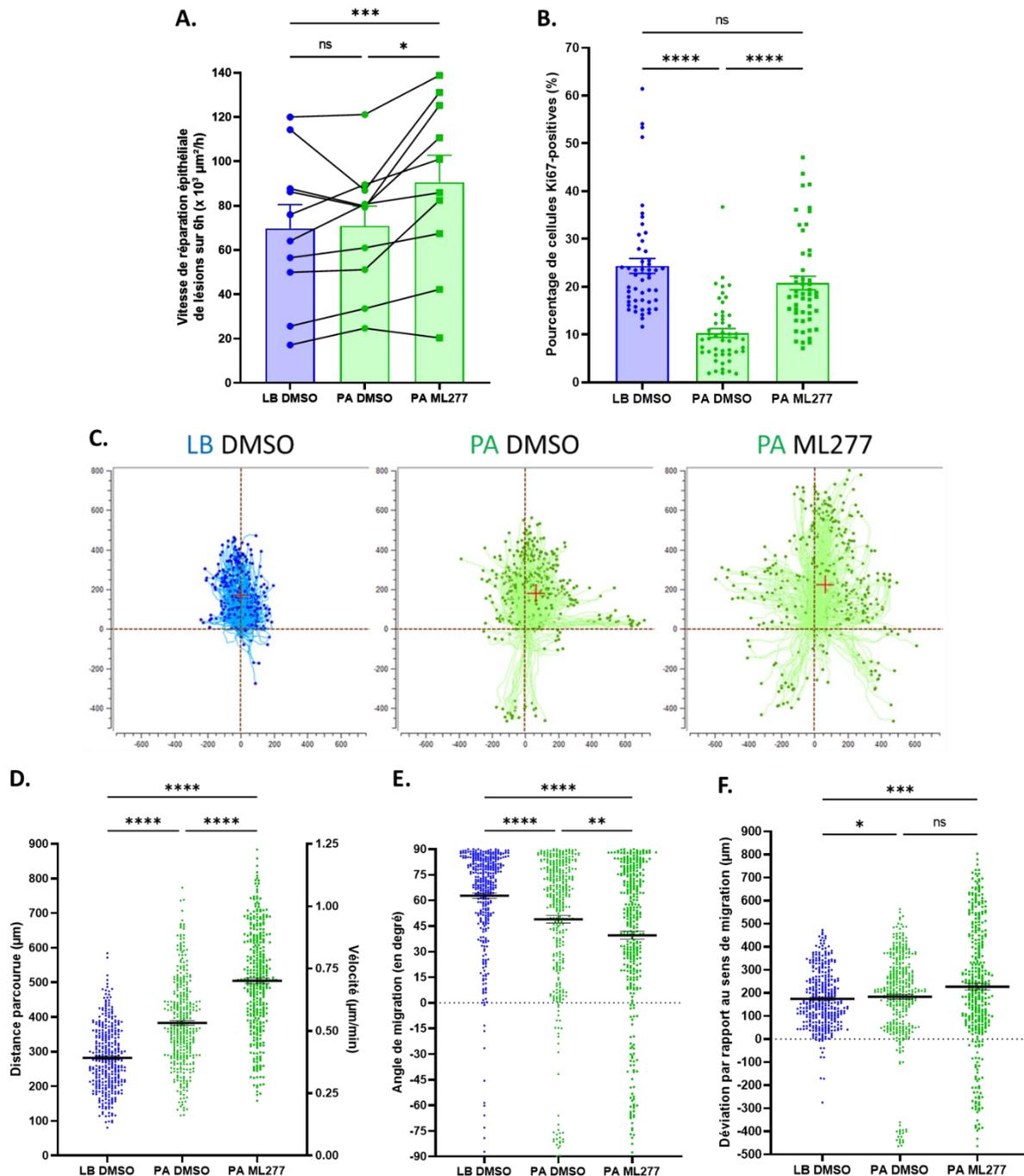


**Figure 29. – Effets de l’activateur de KvLQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de donneurs sains.**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires au ML277 (4 μM) ou au véhicule DMSO (condition contrôle), les cultures primaires de cellules bronchiques de donneurs sains (non-FK) ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau au ML277 ou au DMSO. Les vitesses de réparation ont été mesurées par le logiciel ImageJ, la prolifération par ICY, et les dynamiques de migration par ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool. **A.** Comparaison des vitesses de réparation des lésions épithéliales (n = 10 patients; test-t apparié). **B.** Quantification de la prolifération cellulaire, selon le pourcentage de cellules Ki67-positives normalisé par le nombre total de cellules marquées au DAPI (n = 5 patients; N = 50 images; test Mann-Whitney). **C.** Comparaison des trajectoires de migration des cellules (n = 3 patients; N = 360 cellules). Quantification de la distance et vélocité de migration (**D**) et de l’angle de migration (**E**) des cellules (n = 3 patients; N = 360 cellules; test Mann-Whitney). Chaque point (**C**, **D**, **E**) correspond à une cellule. \*\**P* < 0,01; \*\*\*\**P* < 0,0001.

En présence des VirF de *P. aeruginosa*, la réparation épithéliale n'est que partiellement altérée. Contrairement à ce que nous avons préalablement constaté dans les cultures cellulaires de patients FK (Figures 17 et 20), on ne note ici pas de diminution de la vitesse de réparation des lésions en condition infectieuse à *P. aeruginosa* (Fig. 30A). La prolifération cellulaire (Fig. 30B) et l'angle de migration (Fig. 30E) des cellules sont cependant significativement affectés, tandis que la distance de migration des cellules n'est pas altérée par la présence des VirF de *P. aeruginosa* (Fig. 30D).

On constate ensuite une augmentation statistiquement significative de la vitesse de réparation des lésions (Fig. 30A) et de la prolifération cellulaire (Fig. 30B) grâce au ML277. Au niveau des dynamiques de migration cellulaire, en plus d'améliorer la déviation cellulaire (Fig. 30F), la molécule améliore significativement la distance parcourue par les cellules en migration (Fig. 30D), mais pas leur angle de migration, qui est significativement altéré (Fig. 30E). Dans l'ensemble, l'efficacité du ML277 sur les processus de réparation reste encourageante, surtout au niveau de la distance de migration et de la déviation par rapport au sens de migration, où l'amélioration obtenue par l'activateur est significativement supérieure aux valeurs contrôles, malgré la présence des VirF de PA.



**Figure 30. – Effets de l’activateur de KvLQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de donneurs sains en présence des VirF de *P. aeruginosa*.**

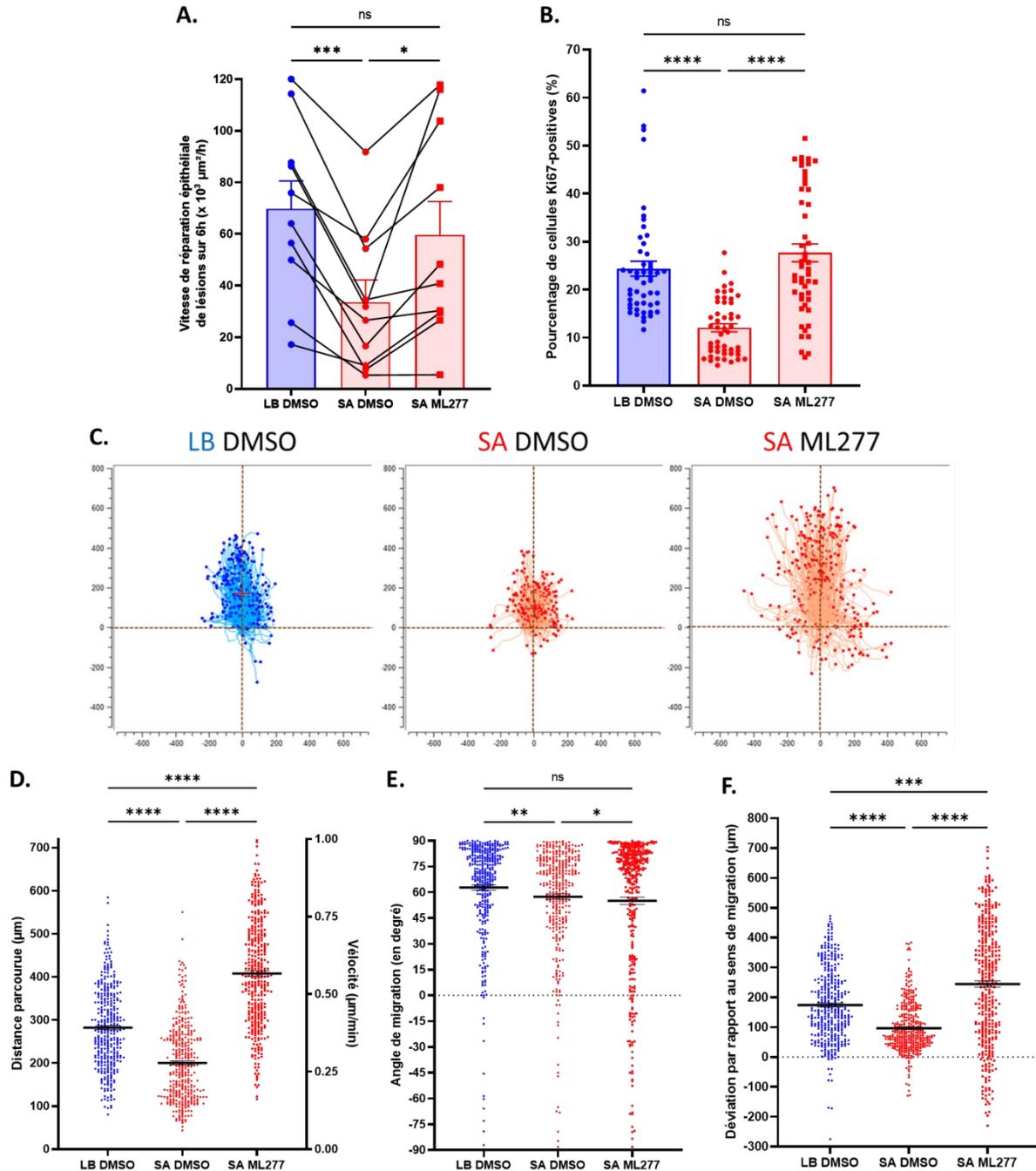
Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires au ML277 (4  $\mu\text{M}$ ) ou au véhicule DMSO (condition contrôle), ainsi qu’aux VirF de *P. aeruginosa* (PA; vert) ou au milieu contrôle LB Lennox (LB; bleu), les cultures primaires de cellules bronchiques de donneurs sains (non-FK) ont été lésées mécaniquement, puis

exposées de nouveau aux mêmes conditions respectives. Les vitesses de réparation ont été mesurées par le logiciel ImageJ, la prolifération par ICY, et les dynamiques de migration par ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool. **A.** Comparaison des vitesses de réparation des lésions épithéliales (n = 10 patients; tests RM one-way ANOVA et post hoc Šidák). **B.** Quantification de la prolifération cellulaire, selon le pourcentage de cellules Ki67-positives normalisé par le nombre total de cellules marquées au DAPI (n = 5 patients; N = 50 images; tests Kruskal-Wallis et post hoc Dunn). **C.** Comparaison des trajectoires de migration des cellules (n = 3 patients; N = 360 cellules). Quantification de la distance et vélocité de migration (**D**), de l'angle de migration (**E**) et de la déviation par rapport au sens de migration (**F**) des cellules (n = 3 patients; N = 360 cellules; tests Kruskal-Wallis et post hoc Dunn). Chaque point (**C**, **D**, **E**, **F**) correspond à une cellule. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

L'effet néfaste des VirF de *S. aureus* sur la réparation épithéliale est davantage notable que ceux de *P. aeruginosa*. De façon significative, la vitesse de réparation des lésions (Fig. 31A) et la prolifération cellulaire (Fig. 31B) sont diminuées de moitié en condition infectieuse à *S. aureus*. Les dynamiques de migration cellulaire sont également toutes altérées, incluant la distance de migration (Fig. 31D), l'angle de migration (Fig. 31E) et la déviation par rapport au sens de migration (Fig. 31F) des cellules significativement affectées en présence des VirF de *S. aureus*.

Grâce à l'activateur de canaux KvLQT1, la majorité de ces paramètres sont améliorés malgré la condition infectieuse à *S. aureus*. En effet, la vitesse de réparation des lésions (Fig. 19A), la prolifération cellulaire (Fig. 31B), la distance de migration (Fig. 31D) et la déviation par rapport au sens de migration (Fig. 31F) des cellules sont significativement augmentées. Le ML277 ne semble cependant pas jouer de rôle sur l'angle de migration des cellules (Fig. 31E).

En outre, tout comme en condition infectieuse à *P. aeruginosa* (Figure 30), les valeurs de distance de migration et de déviation des cellules en condition infectieuse à *S. aureus*, obtenues par le ML277, sont significativement supérieures aux valeurs mesurées en condition contrôle sans infection (Fig. 31D, 31F). Cette conclusion est observable au niveau du profil migratoire des cellules (Fig. 31C), malgré leur dispersion notable dû au manque d'amélioration de l'angle de migration.



**Figure 31. – Effets de l’activateur de KvlQT1 ML277 sur les processus de réparation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques de donneurs sains en présence des VirF de *S. aureus*.**

Après 24h de prétraitement des cultures cellulaires au ML277 (4  $\mu\text{M}$ ) ou au véhicule DMSO (condition contrôle), ainsi qu’aux VirF de *S. aureus* (SA; rouge) ou au milieu contrôle LB Lennox (LB; bleu), les cultures primaires de cellules bronchiques de donneurs sains (non-FK) ont été lésées mécaniquement, puis exposées de nouveau aux mêmes conditions respectives. Les vitesses de réparation ont été mesurées par

le logiciel ImageJ, la prolifération par ICY, et les dynamiques de migration par ImageJ et Chemotaxis and Migration Tool. **A.** Comparaison des vitesses de réparation des lésions épithéliales (n = 10 patients; tests RM one-way ANOVA et post hoc Šidák). **B.** Quantification de la prolifération cellulaire, selon le pourcentage de cellules Ki67-positives normalisé par le nombre total de cellules marquées au DAPI (n = 5 patients; N = 50 images; tests Kruskal-Wallis et post hoc Dunn). **C.** Comparaison des trajectoires de migration des cellules (n = 3 patients; N = 360 cellules). Quantification de la distance et vélocité de migration (**D**), de l'angle de migration (**E**) et de la déviation par rapport au sens de migration (**F**) des cellules (n = 3 patients; N = 360 cellules; tests Kruskal-Wallis et post hoc Dunn). Chaque point (**C**, **D**, **E**, **F**) correspond à une cellule. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

## Chapitre 5 – Discussion

### 5.1 Retour sur les résultats

Mes travaux confirment premièrement que les VirF sécrétés par *P. aeruginosa* et *S. aureus*, les deux bactéries les plus prévalentes dans les VA en FK, altèrent les processus de réparation épithéliale dans les cultures primaires issues de patients FK F508 homozygotes et hétérozygotes (F508del/classe I). Les altérations causées par les VirF de *S. aureus* sont également constatées dans les cultures primaires issues des donneurs sains non-FK, ce qui n'est pas entièrement le cas avec *P. aeruginosa*, dont les VirF altèrent bien la prolifération et les dynamiques de migration cellulaire, mais visiblement pas la réparation lésionnelle.

Mes résultats démontrent ensuite que la combinaison Trikafta (elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor) permet d'améliorer la vitesse de réparation des lésions, la prolifération cellulaire et les dynamiques de migration cellulaire dans les cultures primaires cellulaires lésées de patients FK F508del homozygotes et hétérozygotes (F508del/classe I). Quant à l'activateur ML277, mes travaux montrent un effet bénéfique de ce dernier sur la réparation des lésions, la prolifération cellulaire et la distance parcourue par les cellules en migration, dans les cultures cellulaires lésées de patients FK F508del/classe I, classe I/classe I, ainsi que dans celles de donneurs sains. Cette molécule ne permet cependant pas d'améliorer l'angle de migration cellulaire. Ces données prometteuses indiquant une efficacité de ces deux traitements sont observées en absence, comme en présence des VirF nocifs de *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

Finalement, il semblerait que la combinaison du traitement Trikafta et de l'activateur ML277 ne semble pas avoir d'effet additif sur les processus de réparation épithéliale des monocouches cellulaires de patients FK F508del/classe I.

### 5.1.1 Conséquences des infections bactériennes sur la réparation de l'épithélium

D'après mes résultats, les VirF de *P. aeruginosa* et *S. aureus* exercent un effet délétère sur la réparation épithéliale. Les VirF de PACF508 réduisent significativement la vitesse de réparation des lésions (dans la majorité des cultures cellulaires), ainsi que la prolifération cellulaire de monocouches en cours de réparation, et affectent leur angle de migration. Mes travaux confirment ceux précédemment réalisés au laboratoire, où il a en effet été démontré que les VirF provenant de *P. aeruginosa* ont un impact délétère sur la réparation épithéliale des VA, FK comme non FK, en altérant plus précisément la prolifération et la migration cellulaire, ainsi que la vitesse de réparation des lésions (147,150). Nombreux sont les VirF de la bactérie *P. aeruginosa* pouvant être responsables de ces altérations, comme la protéase LasA, l'élastase LasB, la lectine B, les exotoxines A (ExoA) et T (ExoT), et la pyocyanine, tous démontrés comme délétères à la réparation épithéliale (à partir de différents modèles expérimentaux). Les mécanismes en cause sont multiples : augmentation de l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B, dégradation de  $\beta$ 1-intégrine et  $\beta$ -caténine, diminution de l'expression des cyclines, désorganisation du cytosquelette et des lamellipodes, ou encore induction d'espèces réactives de l'oxygène (228–231). Les VirF spécifiques de la souche clinique PACF508 ici utilisée, LasA et LasB, ont été démontrés au laboratoire comme responsables de l'impact délétère de *P. aeruginosa* sur la réparation épithéliale, de par le blocage du système QS sécréteur de ces VirF qui inhibe alors leur effet néfaste (150). Il faut cependant noter que ces résultats sont dépendants de la souche clinique de *P. aeruginosa* utilisée, et que les résultats en découlant peuvent différer d'une souche à l'autre, comme il a auparavant pu être observé (136).

Les altérations des processus de réparation épithéliale observées sont cohérentes avec l'atteinte attribuée aux infections bactériennes des VA sur les mécanismes migratoires des cellules épithéliales, l'intégrité de l'épithélium et le déclin de la fonction pulmonaire (123,136,146). Ces résultats confirment que la conséquence néfaste de *P. aeruginosa* dans les dynamiques de la migration cellulaire réside majoritairement dans la perte de directionnalité des cellules migratoires, tel que démontré précédemment au laboratoire (150), et moins dans le potentiel de

migration (en termes de distance). Il a été démontré par une autre équipe que la bactérie *P. aeruginosa* peut adopter un comportement « explorateur » pour son environnement, altérant la directionnalité de sa migration (232). À moins que les VirF de la bactérie soient en cause, cette piste n'est cependant pas directement transposable aux résultats présentés ici, étant donné que les cultures cellulaires utilisées dans le cadre de ce projet n'ont pas été directement exposées aux bactéries mais à leurs VirF.

Malgré la cohérence de ces résultats avec la littérature dans les cultures FK, l'inhibition de la réparation des lésions à cause des VirF de *P. aeruginosa* n'a cependant pas été retrouvée dans mes expérimentations avec les cultures de donneurs sains (non-FK). Il a pourtant été démontré précédemment au laboratoire que les VirF de PACF508 affectaient cette réparation (150). Plusieurs facteurs peuvent être en cause de cette différence de résultats, tels que la possible perte d'effet de virulence des VirF de la bactérie avec le temps. Une autre hypothèse peut être avancée afin d'expliquer cette anomalie dans les cultures cellulaires de donneurs sains. Étant donné que les VirF de *P. aeruginosa* affectent l'angle de migration des cellules, mais pas leur distance de migration, celles-ci avancent plus loin mais pas dans le sens optimal de la réparation. Il est alors possible que, dans la mesure de vitesse de réparation des lésions, ce phénomène amène à des mesures similaires aux valeurs en condition contrôle, de par le front épithélial avançant tout de même vers le front lésionnel opposé. Ces arguments n'expliquent cependant pas le fait que l'absence d'effet inhibiteur des VirF de *P. aeruginosa* sur la réparation épithéliale ne soit alors observée que dans les cultures de donneurs sains. Ce n'est effectivement pas le cas des cultures des patients FK, la raison pouvant alors être que les cellules composant ces cultures présentent une mémoire quant aux infections précédemment subies, et fassent preuve d'une plus grande sensibilité aux VirF présents, même si leur virulence est réduite.

Mes travaux démontrent également un fort effet inhibiteur des VirF de *S. aureus* sur la vitesse de réparation des lésions, la prolifération et les dynamiques de migration cellulaire. Ces résultats concordent avec de précédentes découvertes du laboratoire sur la réparation épithéliale, où les VirF de *S. aureus* altèrent la vitesse de réparation des lésions et la formation des protrusions, responsables de la migration cellulaire, dans des cultures de cellules de VA nasales (153). De nouveaux résultats s'ajoutent à ces connaissances, la prolifération cellulaire et les dynamiques de

migration cellulaire comme la distance, l'angle et la déviation de migration, en présence des VirF de *S. aureus*, n'ayant pas été étudiées auparavant. Les VirF spécifiquement responsables dans le cas de *S. aureus* ne sont cependant pas connus, mais des données préliminaires du laboratoire pointent vers les hémolysines alpha (Hla) et bêta (Hlb), Hla semblant davantage délétère. Leur forte virulence délétère face à la réparation épithéliale, contrôlée par un faible dosage en conséquence, a été démontrée annulée lorsque des mutants de Hla et Hlb sont utilisés, ce qui semble confirmer que ces VirF sont en cause. On comprend maintenant que les VirF de *S. aureus* affectent fortement les processus de réparation et, à partir des données de migration guidée présentées ici, semblent inhiber le potentiel de migration des cellules, en plus de leur directionnalité.

### **5.1.2 Effets des stratégies thérapeutiques sur la réparation épithéliale en condition infectieuse**

#### 5.1.2.1 Effet de la triple combinaison de modulateurs de CFTR Trikafta

L'effet du Trikafta sur la réparation épithéliale de cultures primaires de cellules épithéliales des VA était jusqu'à présent méconnu. Ces résultats permettent de constater pour la première fois que ce traitement mène à une amélioration des processus de réparation épithéliale, au travers de la stimulation de la vitesse de réparation des lésions, de la prolifération cellulaire et des dynamiques de migration cellulaire. Les processus de réparation épithéliale sont essentiels à la physiologie du poumon, afin de préserver son intégrité. En cas de dommages épithéliaux, comme ceux causés par les infections bactériennes, sa restauration est cruciale mais elle est altérée, en partie à cause de son environnement infectieux. Comme présenté précédemment, plusieurs travaux du laboratoire ont démontré que cette réparation épithéliale dépend de l'activité fonctionnelle du canal CFTR, et qu'en contexte de FK, elle est améliorée grâce à la correction fonctionnelle du CFTR muté, mais que les VirF de *P. aeruginosa* atténuent cependant cet effet bénéfique obtenu par la correction (41,147–149). Il a effectivement été démontré que la correction de CFTR et la réparation épithéliale à partir des modulateurs VX-809 et VX-770 (Orkambi) sont affectées par la condition infectieuse à *P. aeruginosa*, dans des cultures primaires de patients FK (147). L'amélioration des différents processus de réparation épithéliale à partir de

la correction fonctionnelle du CFTR muté grâce au Trikafta, peut être expliquée par différents mécanismes. Effectivement, la stimulation de la protrusion des lamellipodes, la signalisation et l'activation des intégrines, la diminution de la signalisation de NF- $\kappa$ B et les interactions entre CFTR et le cytosquelette sont, entre autres, plusieurs explications à l'effet bénéfique qu'a la correction de CFTR sur la réparation épithéliale (42,62,65,68–70).

Une récente étude s'est penchée sur l'effet de la combinaison Trikafta sur la réparation épithéliale de cultures de lignées cellulaires, et a constaté que la correction de CFTR par les modulateurs VX-445, VX-661 et VX-770 combinés permet une amélioration de la réparation épithéliale, ainsi que de sa fonction et de sa maturation (212). Cette première étude sur le Trikafta repose cependant sur une analyse non exhaustive de la réparation épithéliale, ainsi que sur l'utilisation de lignées cellulaires en absence de condition infectieuse. L'étude adresse alors l'intérêt de continuer d'investiguer l'effet du Trikafta en utilisant des cultures primaires de cellules épithéliales des VA. Mes résultats confirment ces premières conclusions, et les complètent de par l'exposition des cultures primaires aux VirF des bactéries. Une anomalie observée dans mes données réside dans l'altération significative de l'angle de migration cellulaire dans les cultures de patients FKF508del/classe I (Fig. 19E), une incohérence qui serait possiblement résolue avec des données supplémentaires.

La diminution de l'effet bénéfique du Trikafta en présence des VirF de *P. aeruginosa* et *S. aureus* observée dans mes résultats concordent également avec ceux observés dans le laboratoire avec le correcteur VRT-325 et la combinaison Orkambi (147,149). La confirmation de l'efficacité des modulateurs de CFTR dans les cultures primaires de patients FK F508del homozygotes comme hétérozygotes (147) est également retrouvée ici avec le Trikafta qui démontre être similairement efficace entre ces deux groupes, en absence comme en présence des VirF de *P. aeruginosa* et de *S. aureus*.

#### 5.1.2.2 Effet de l'activateur de KvLQT1 ML277

Ces résultats démontrent pour la première fois la fonction du canal potassique KvLQT1 dans la réparation épithéliale de cultures primaires de cellules bronchiques des VA, de par son activation grâce au ML277. Plus précisément, mes données démontrent que le ML277 permet d'améliorer

la vitesse de réparation des lésions, la prolifération cellulaire et la distance parcourue par les cellulaires migratoires, et ce, en absence comme en présence des VirF de *P. aeruginosa* et *S. aureus*. L'amélioration de la vitesse de réparation des lésions dans les cultures primaires d'un patient FK classe I/classe I, éligible à aucun des traitements actuellement disponibles afin de corriger le défaut de CFTR en FK, représente également un résultat préliminaire encourageant.

La fonction de canaux K<sup>+</sup> dans les processus de réparation épithéliale a précédemment été étudiée et documentée dans le laboratoire, en partie grâce à la modulation de KCa3.1 et K<sub>ATP</sub> (par l'activateur pinacidil) (17,28–30,233), démontrant l'implication des canaux potassiques dans la prolifération et la migration cellulaire. Plus spécifiquement, l'activité du canal KvLQT1 stimule la réparation épithéliale, au travers de la prolifération et la migration cellulaire, de par la régulation de la progression des cycles cellulaires, la modulation de l'activité des intégrines et les interactions avec les facteurs de croissance auxquelles le canal contribue (17,28–30).

Similairement au KvLQT1, la fonction du R-L3, un autre activateur de KvLQT1, n'a pas été encore documentée au niveau de cultures primaires de cellules bronchiques, mais les données préliminaires du laboratoire semblent confirmer l'effet bénéfique de l'activation de ce canal sur la réparation épithéliale. Ces résultats apportent donc une nouvelle découverte quant à la modulation de KvLQT1 par l'activateur ML277, qui se montre prometteuse afin d'améliorer la réparation épithéliale en majeure partie, en condition non infectieuse comme infectieuse.

Si le ML277 permet d'améliorer l'angle de migration cellulaire en condition aseptique, cet effet bénéfique n'est cependant pas observable en condition infectieuse, la directionnalité des cellules n'étant pas améliorée par l'activation de KvLQT1 en présence des VirF de *P. aeruginosa* ou *S. aureus*. Nous savons effectivement que ces VirF affectent la capacité de migration des cellules en réparation, un aspect de la réparation épithéliale qui est adressé grâce à la correction fonctionnelle de CFTR. Ce canal joue un rôle majeur dans ce processus, de par la formation des protrusions à l'avant des cellules afin qu'elles migrent efficacement vers le site lésionnel en réparation, par exemple (42). Le défaut de CFTR n'est cependant pas corrigé par l'activateur ML277, ce qui pourrait expliquer pourquoi l'activation des canaux potassiques stimule la migration cellulaire de par la distance de migration des cellules en réparation, mais non pas par

l'angle de migration qui est altéré en condition infectieuse. En prenant cependant en compte les autres processus réparateurs (fermeture lésionnelle, prolifération cellulaire, distance de migration), le ML277 semble néanmoins aider à l'amélioration de la réparation épithéliale dans son ensemble. De plus, nous avons formulé l'hypothèse que cet activateur représenterait une avenue thérapeutique prometteuse pour les patients FK lorsque couplé à un traitement avec les modulateurs de CFTR qui corrigeraient le défaut du canal en contexte de FK, un effet additif espéré cependant non observé dans mes données préliminaires.

### 5.1.2.3 Stratégie combinatoire avec le Trikafta et le ML277

Une nouvelle stratégie thérapeutique, combinant la triple combinaison Trikafta avec l'activateur de KvLQT1 ML277, a finalement été ici étudiée dans l'optique d'observer un possible effet synergique de ces deux derniers sur la réparation épithéliale de cultures primaires de patients FK F508del/classe I. Mes résultats ne semblent cependant pas indiquer d'effet additif des deux traitements combinés pour les étapes de la réparation épithéliale mesurées. L'amélioration de ces processus est en effet similaire aux effets bénéfiques obtenus par le Trikafta ou le ML277 seul.

Cette perspective étant étudiée pour la première fois dans ce contexte de réparation épithéliale, des données supplémentaires et plus exhaustives sont requises afin d'améliorer notre compréhension de la fonction et de l'efficacité des stratégies combinatoires.

## 5.2 Implications cliniques

Les nombreux traitements symptomatiques développés ces dernières décennies aident à pallier au déclin de la santé des patients FK, mais la source du problème reste inchangée. Le défaut de base du CFTR n'étant pas corrigé, la détérioration de l'état des patients est inévitable, impliquant un suivi quotidien de ces traitements oppressants, aussi bien physiquement que mentalement (181). Mettre au point de nouvelles thérapies permettant la correction fonctionnelle du CFTR quel que soit le type de mutation représente alors un défi actuel et essentiel afin d'adresser cette situation.

Dans une perspective de médecine personnalisée, l'objectif de nos recherches est d'identifier les meilleures combinaisons thérapeutiques, adaptées aux mutations de CFTR et à l'environnement infectieux du patient, à l'aide des modulateurs de CFTR, d'activateurs de canaux potassiques et de facteurs d'anti-virulence (section 5.4). Cette perspective est en partie adressée à l'aide de ces résultats qui s'ajoutent à une accumulation grandissante de données concernant les nouvelles approches thérapeutiques en FK, dans l'objectif d'adresser le besoin de nouveaux traitements pour les patients sans option. En effet, de nombreux patients FK arborant des mutations sévères, comme celles de classe I, ne sont pas éligibles aux traitements tels que le Trikafta, et n'ont alors aucune option thérapeutique s'offrant à eux afin de corriger fonctionnellement le défaut de CFTR en FK.

L'effet bénéfique observé du ML277 dans mes expérimentations contribue à la preuve de concept que cibler les canaux potassiques représente une avenue intéressante afin d'améliorer la réparation épithéliale. Le potentiel de cet activateur de KvLQT1 pourrait aider à la régénération tissulaire, palliant aux dommages épithéliaux causés par les infections pulmonaires en FK, mais cette conclusion reste cependant expérimentale. Si démontré efficace et sécuritaire, l'administration *in vivo* du ML277 devrait par exemple être réalisée en aérosol, car les canaux KvLQT1 sont aussi présents dans le cœur et leur activité ne devrait pas être altérée ailleurs que dans les poumons ciblés. L'utilité du ML277 pourrait s'étendre aux personnes non-FK mais souffrant d'infections bactériennes, comme les patients MPOC (maladie pulmonaire obstructive chronique), qui présentent de fréquentes infections pulmonaires chroniques, ainsi qu'une diminution acquise de CFTR, menant à des dommages épithéliaux dans leurs VA (234).

L'utilisation de cellules bronchiques primaires de patients FK, en tant que modèle expérimental, attribue à mes résultats une pertinence clinique supérieure à celle de lignées cellulaires comme les CFBE (« cystic fibrosis bronchial epithelial cell line »). Les lignées cellulaires représentent une utilité d'un point de vue mécanistique, mais moins au niveau clinique. Celles-ci ne sont pas aussi représentatives que les cellules primaires, et à mesure des passages cellulaires, leur caractéristique immortelle amène à des variations génotypiques, phénotypiques et dans l'expression de CFTR (235–237).

L'opportunité d'avoir réalisé mes expériences avec les souches bactériennes cliniques PACF508 et SA29213, généreusement fournies par nos collaborateurs, me permet également de mesurer plus vraisemblablement l'effet des infections bactériennes à *P. aeruginosa* et *S. aureus* sur la réparation épithéliale. Bien que ces souches prototypiques soient considérées comme des références, il faut cependant préciser qu'elles sont probablement différentes des souches chez les patients FK responsables de leurs infections bactériennes. L'exposition des cellules épithéliales à leurs VirF permet une meilleure représentation de l'infection des VA chez les patients FK, la virulence bactérienne résidant dans les VirF en contact avec l'épithélium, et non dans les bactéries qui restent logées dans la couche de mucus supérieure (126).

Le désir d'étendre l'accessibilité des traitements de la FK doit toutefois prendre en considération la réalité des patients : le coût des traitements est prohibitif, rendant ces thérapies indisponibles ou inabordables dans de nombreux pays (174). L'espoir que représentent les derniers traitements pour le futur de la FK, tels que la combinaison Trikafta, est atténué par son grand coût financier (plus de 300 000\$ par an aux États-Unis), menant à des inégalités dans le traitement de la FK. Il est donc essentiel que les stratégies thérapeutiques actuelles et futures s'orientent vers l'ensemble des patients FK, tant au niveau de leur accessibilité par rapport aux mutations CFTR des patients, que par rapport à leur coût financier (174,238).

### **5.3 Limitations expérimentales**

Ces données préliminaires sont intéressantes, mais des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de statistiquement confirmer toutes les tendances observées. En effet, ces données permettent d'apporter une première évaluation quant à l'effet bénéfique des traitements du Trikafta et du ML277 sur la réparation épithéliale, mais un plus grand nombre de données permettrait de possiblement écarter certains biais. Cela inclut l'absence d'effet néfaste des VirF de *P. aeruginosa* dans la vitesse de réparation des lésions des cultures de donneurs sains (Fig. 30A), ou l'hétérogénéité inter-patients parfois présente.

Également, l'efficacité du Trikafta et du ML277 sur la réparation épithéliale ne peut être considérée totalement confirmée sans avoir réalisé une analyse plus exhaustive des processus

réparateurs d'un épithélium intègre et fonctionnel. Les autres étapes essentielles à la régénération fonctionnelle de l'épithélium doivent être investiguées, telles que l'étalement cellulaire, la redifférenciation cellulaire et la fonctionnalité de l'épithélium (17). Cela comprend aussi l'étude de l'expression fonctionnelle du canal CFTR à la membrane, étant donné que nous ne savons pas encore la conséquence de l'infection sur sa correction avec le Trikafta.

L'étude de la régénération d'un épithélium fonctionnel implique alors l'utilisation d'un autre modèle. Mes expériences ont reposé sur l'utilisation de cultures primaires de cellules basales progénitrices indifférenciées et, bien que ce modèle 2D soit efficace et requis pour l'analyse réalisée, comme celle des dynamiques de migration guidée, il est expérimentalement limitant. En effet, malgré une bonne réparation des cultures primaires de cellules bronchiques des patients, l'intégrité épithéliale n'est pas encore restaurée et l'épithélium reste indifférencié. Une étude exhaustive de la réparation épithéliale implique alors l'analyse de la redifférenciation cellulaire et fonctionnalité épithéliale, une étape plus tardive de la réparation. Cela nécessite alors l'utilisation de cultures cellulaires en interface air-liquide (IAL) qui permettent, au bout de 35 jours en IAL, d'obtenir un épithélium différencié, composé de cellules ciliées et sécrétoires. Ce modèle 3D représente le « gold standard » des études précliniques (239).

Une autre critique peut être apportée quant aux cultures cellulaires de donneurs sains. Ces cellules sont originellement isolées de segments de bronches de ces donneurs, et subissent alors une ischémie froide entre la transplantation pulmonaire et l'isolation des cellules épithéliales. Cette période pourrait par la suite altérer la croissance et la viabilité cellulaire, un phénomène déjà observé dans des cellules épithéliales rénales isolées (240).

Une limite plus théorique peut être adressée quant à notre compréhension de l'activité du canal KvLQT1 au niveau pulmonaire, ce dernier étant surtout étudié au niveau cardiaque. Sa modulation par l'activateur ML277 dans des cellules bronchiques apporte cependant des données préliminaires aidant à cette optique.

## 5.4 Perspectives

Une étude exhaustive de la réparation épithéliale requiert l'analyse des autres étapes qui y contribuent, comme l'étalement cellulaire, la première d'entre elles, qui pourrait être étudié par marquage cytosquelettique. À l'aide d'un modèle 3D, la redifférenciation cellulaire devrait également être analysée par marquage de différenciation afin d'étudier la régénération de cellules différenciées dans l'épithélium, comme les cellules ciliées (avec FoxJ1 et  $\beta$ -tubuline), les cellules sécrétrices (avec MUC5AC et MUC5B) et les cellules basales (avec CK13) (241). Ce modèle permettrait aussi d'analyser l'intégrité épithéliale, par mesures de la résistance transépithéliale (RTE). La fonctionnalité de l'épithélium réparé pourrait ensuite être étudiée, au travers de la fréquence des battements ciliaires, par vidéomicroscopie, et du volume d'ASL, par imagerie au microscope. L'expression fonctionnelle de CFTR dans ces épithéliums devrait également être vérifiée, en mesurant la maturation de CFTR par immunobuvardage (WB), sa localisation à la membrane par immunofluorescence, et sa fonctionnalité par mesures des courants électrophysiologiques en chambre de Ussing. L'ensemble de ces techniques expérimentales sont documentées et maîtrisées par plusieurs laboratoires, dont le nôtre, assurant la faisabilité de ces travaux (147–150,242–244).

Également, un modèle 3D *ex vivo* de PCLS (« precision-cut lung slices ») est actuellement mis au point au laboratoire à partir des tissus pulmonaires explantés lors de transplantations pulmonaires. L'avantage de ce modèle est qu'il permet l'étude spatiale et fonctionnelle de structures complètes des VA, en comprenant l'interstitium, la vascularisation et le mésothélium en plus de l'épithélium cellulaire (245). L'utilisation de ce modèle permettrait d'étudier plus adéquatement la différenciation et l'intégrité de l'épithélium, ainsi que sa fonctionnalité, selon les mêmes méthodes présentées précédemment.

Les effets néfastes des infections pulmonaires devraient aussi être examinés davantage. Étant donné la co-infection fréquente des VA des patients FK par les bactéries *P. aeruginosa* et *S. aureus* (123–125), leur conséquence combinée sur les processus de réparation épithéliale devrait être étudiée. Comme introduit précédemment, d'autres infections pulmonaires prévalent également

en FK et leur étude serait intéressante afin d'adresser les infections pulmonaires dont souffrent tous les patients (72).

Des stratégies d'anti-virulence sont envisageables, et actuellement à l'étude au laboratoire, une avenue prometteuse compte tenu des précédents résultats du laboratoire à ce niveau (148,150). L'inhibition de la production des VirF par les systèmes QS de *P. aeruginosa* prévient effectivement l'effet délétère de la bactérie. L'utilisation d'inhibiteurs du QS, ou d'enzymes du système quorum quenching (QQ) comme les lactonases, est donc présentement investiguée comme stratégie dans notre équipe afin d'inactiver la signalisation bactérienne responsable de la production de ces VirF. Concernant *S. aureus*, sa virulence liée à l'hémolysine Hla semble être neutralisée grâce à l'anticorps monoclonal MEDI4893, une autre stratégie d'anti-virulence qui sera étudiée au laboratoire dans le cadre de ce projet (246).

## 5.5 Conclusions

Mes résultats vérifient donc que les infections bactériennes à *P. aeruginosa* et *S. aureus* ont une conséquence néfaste sur les différents processus de réparation épithéliale des VA humaines, mais que les traitements au Trikafta et au ML277 permettent respectivement de stimuler cette réparation, et ce, malgré la condition infectieuse. Un effet synergique de ces deux traitements combinés n'a cependant pas été obtenu, mais cela n'enlève rien à la perspective des stratégies combinatoires et/ou non-restreintes aux mutations CFTR, qui a besoin d'être explorée davantage, afin de permettre une restauration intègre et fonctionnelle de l'épithélium des VA pour tous les patients FK, quelles que soient leurs mutations. L'étude exhaustive de l'ensemble des avenues thérapeutiques présentées permettra d'évaluer l'efficacité de nouvelles stratégies innovantes, ainsi que de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires derrière la correction fonctionnelle de CFTR, afin de favoriser la restauration de l'intégrité pulmonaire., l'aspect clé dans le traitement de la FK.

## Références bibliographiques

1. Ahookhosh K, Pourmehran O, Aminfar H, Mohammadpourfard M, Sarafraz MM, Hamishehkar H. Development of human respiratory airway models: A review. *Eur J Pharm Sci.* 30 mars 2020;145:105233.
2. Cheng YS. Aerosol Deposition in the Extrathoracic Region. *Aerosol Sci Technol J Am Assoc Aerosol Res.* 2003;37(8):659-71.
3. Yaqub N, Wayne G, Birchall M, Song W. Recent advances in human respiratory epithelium models for drug discovery. *Biotechnol Adv.* 1 janv 2022;54:107832.
4. Hofmann W. Modelling inhaled particle deposition in the human lung—A review. *J Aerosol Sci.* 1 oct 2011;42(10):693-724.
5. Fraser RS. Histology and gross anatomy of the respiratory tract. In: *Physiologic Basis of Respiratory Disease.* Hamilton: BC Decker Inc; 2005. p. 1-14.
6. Rock JR, Randell SH, Hogan BLM. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech.* 1 sept 2010;3(9-10):545-56.
7. Plasschaert LW, Žilionis R, Choo-Wing R, Savova V, Knehr J, Roma G, et al. A single cell atlas of the tracheal epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature.* août 2018;560(7718):377-81.
8. Barbry P, Cavard A, Chanson M, Jaffe AB, Plasschaert LW. Regeneration of airway epithelial cells to study rare cell states in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 1 mars 2020;19:S42-6.
9. Hanssens LS, Duchateau J, Casimir GJ. CFTR Protein: Not Just a Chloride Channel? *Cells.* 22 oct 2021;10(11):2844.
10. Hollenhorst MI, Richter K, Fronius M. Ion Transport by Pulmonary Epithelia. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:174306.
11. Downs C. Chapter 2 - Ion Transport and Lung Fluid Balance. In: Sidhaye VK, Koval M, éditeurs. *Lung Epithelial Biology in the Pathogenesis of Pulmonary Disease* [Internet]. Boston: Academic Press; 2017 [cité 9 avr 2023]. p. 21-31. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128038093000026>
12. Beard LL, Li T, Hu Y, Folkesson HG. Fetal Lung Epithelial Ion Channels Relocate in the Cell Membrane During Late Gestation. *Anat Rec.* 2011;294(9):1461-71.
13. Davis IC, Matalon S. Epithelial Sodium Channels in the Adult Lung – Important Modulators of Pulmonary Health and Disease. *Hypoxia Circ.* 2007;618:127-40.

14. Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, et al. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in  $\alpha$ ENaC-deficient mice. *Nat Genet.* mars 1996;12(3):325-8.
15. Marunaka Y, Niisato N, Taruno A, Ohta M, Miyazaki H, Hosogi S, et al. Regulation of Epithelial Sodium Transport via Epithelial Na<sup>+</sup> Channel. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:978196.
16. Bardou O, Trinh NTN, Brochiero E. Canaux potassiques et physiologie de l'épithélium respiratoire. *médecine/sciences.* 1 avr 2009;25(4):391-7.
17. Girault A, Brochiero E. Evidence of K<sup>+</sup> channel function in epithelial cell migration, proliferation, and repair. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 15 févr 2014;306(4):C307-19.
18. Bleich M, Warth R. The very small-conductance K<sup>+</sup> channel KVLQT1 and epithelial function. *Pflüg Arch.* 1 juin 2000;440(2):202-6.
19. Pusch M. Increase of the single-channel conductance of KvLQT1 potassium channels induced by the association with minK. *Pflüg Arch.* 1 nov 1998;437(1):172-4.
20. Abbott GW. Biology of the KCNQ1 Potassium Channel. *New J Sci.* 29 janv 2014;2014:e237431.
21. Bardou O, Trinh NTN, Brochiero E. Molecular diversity and function of K<sup>+</sup> channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* févr 2009;296(2):L145-55.
22. Yang WP, Levesque PC, Little WA, Conder ML, Shalaby FY, Blammaris MA. KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 avr 1997;94(8):4017-21.
23. O'Grady SM, Lee SY. Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 1 août 2005;37(8):1578-94.
24. Leroy C, Dagenais A, Berthiaume Y, Brochiero E. Molecular identity and function in transepithelial transport of KATP channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* mai 2004;286(5):L1027-37.
25. Han DY, Nie HG, Gu X, Nayak RC, Su XF, Fu J, et al. K<sup>+</sup> channel openers restore verapamil-inhibited lung fluid resolution and transepithelial ion transport. *Respir Res.* 2010;11(1):65.
26. Bardou O, Privé A, Migneault F, Roy-Camille K, Dagenais A, Berthiaume Y, et al. K<sup>+</sup> channels regulate ENaC expression via changes in promoter activity and control fluid clearance in alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 1 juill 2012;1818(7):1682-90.

27. Leroy C, Privé A, Bourret JC, Berthiaume Y, Ferraro P, Brochiero E. Regulation of ENaC and CFTR expression with K<sup>+</sup> channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. déc 2006;291(6):L1207-19.
28. Trinh NTN, Privé A, Kheir L, Bourret JC, Hijazi T, Amraei MG, et al. Involvement of KATP and KvLQT1 K<sup>+</sup> channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. oct 2007;293(4):L870-82.
29. Trinh NTN, Privé A, Maillé E, Noël J, Brochiero E. EGF and K<sup>+</sup> channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. nov 2008;295(5):L866-80.
30. Girault A, Privé A, Trinh NTN, Bardou O, Ferraro P, Joubert P, et al. Identification of KvLQT1 K<sup>+</sup> channels as new regulators of non-small cell lung cancer cell proliferation and migration. *Int J Oncol*. 1 mars 2014;44(3):838-48.
31. Borowitz D. CFTR, bicarbonate, and the pathophysiology of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2015;50(S40):S24-S30.
32. Lukasiak A, Zajac M. The Distribution and Role of the CFTR Protein in the Intracellular Compartments. *Membranes*. 22 oct 2021;11(11):804.
33. Harding R, Hooper SB. Regulation of lung expansion and lung growth before birth. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. juill 1996;81(1):209-24.
34. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, et al. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*. mai 1991;10(1):214-28.
35. Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiol Rev*. janv 1999;79(1):S23-45.
36. Moran O. The gating of the CFTR channel. *Cell Mol Life Sci*. 1 janv 2017;74(1):85-92.
37. Rogan MP, Stoltz DA, Hornick DB. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Intracellular Processing, Trafficking, and Opportunities for Mutation-Specific Treatment. *Chest*. 1 juin 2011;139(6):1480-90.
38. Brochiero E, Dagenais A, Privé A, Berthiaume Y, Grygorczyk R. Evidence of a functional CFTR Cl<sup>-</sup> channel in adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. août 2004;287(2):L382-92.
39. Fang X, Song Y, Hirsch J, Galiotta LJV, Pedemonte N, Zemans RL, et al. Contribution of CFTR to apical-basolateral fluid transport in cultured human alveolar epithelial type II cells. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. févr 2006;290(2):L242-9.

40. Okuda K, Dang H, Kobayashi Y, Carraro G, Nakano S, Chen G, et al. Secretory Cells Dominate Airway CFTR Expression and Function in Human Airway Superficial Epithelia. *Am J Respir Crit Care Med*. mai 2021;203(10):1275.
41. Trinh NTN, Bardou O, Privé A, Maillé E, Adam D, Lingée S, et al. Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. *Eur Respir J*. 1 déc 2012;40(6):1390-400.
42. Schiller KR, Maniak PJ, O'Grady SM. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair. *Am J Physiol Cell Physiol*. nov 2010;299(5):C912-921.
43. Bustamante-Marin XM, Ostrowski LE. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. avr 2017 [cité 13 avr 2023];9(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5378048/>
44. Munkholm M, Mortensen J. Mucociliary clearance: pathophysiological aspects. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2014;34(3):171-7.
45. Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway Epithelial Cells. *Proc Am Thorac Soc*. 15 sept 2008;5(7):772-7.
46. Thelin WR, Boucher RC. The epithelium as a target for therapy in cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol*. 1 juin 2007;7(3):290-5.
47. Button B, Cai LH, Ehre C, Kesimer M, Hill DB, Sheehan JK, et al. Periciliary Brush Promotes the Lung Health by Separating the Mucus Layer from Airway Epithelia. *Science*. 24 août 2012;337(6097):937-41.
48. Hiemstra PS, McCray PB, Bals R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur Respir J*. avr 2015;45(4):1150-62.
49. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 19 mars 2010;140(6):805-20.
50. Varelle M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. The Airway Epithelium: Soldier in the Fight against Respiratory Viruses. *Clin Microbiol Rev*. janv 2011;24(1):210-29.
51. Bruscia EM, Bonfield TL. Cystic Fibrosis Lung Immunity: The Role of the Macrophage. *J Innate Immun*. nov 2016;8(6):550-63.
52. Voynow JA, Shinbashi M. Neutrophil Elastase and Chronic Lung Disease. *Biomolecules*. 21 juill 2021;11(8):1065.
53. Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. juin 2010;298(6):L715-31.

54. Iosifidis T, Garratt LW, Coombe DR, Knight DA, Stick SM, Kicic A. Airway epithelial repair in health and disease: Orchestrator or simply a player? *Respirology*. 2016;21(3):438-48.
55. Schwab A. Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol-Ren Physiol*. mai 2001;280(5):F739-47.
56. Schwab A, Fabian A, Hanley PJ, Stock C. Role of Ion Channels and Transporters in Cell Migration. *Physiol Rev*. oct 2012;92(4):1865-913.
57. Coraux C, Hajj R, Lesimple P, Puchelle E. Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire. *médecine/sciences*. 1 déc 2005;21(12):1063-9.
58. Coraux C, Roux J, Jolly T, Birembaut P. Epithelial Cell–Extracellular Matrix Interactions and Stem Cells in Airway Epithelial Regeneration. *Proc Am Thorac Soc*. 15 août 2008;5(6):689-94.
59. White SR, Dorscheid DR, Rabe KF, Wojcik KR, Hamann KJ. Role of Very Late Adhesion Integrins in Mediating Repair of Human Airway Epithelial Cell Monolayers after Mechanical Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. avr 1999;20(4):787-96.
60. Wickström SA, Fässler R. Regulation of membrane traffic by integrin signaling. *Trends Cell Biol*. 1 mai 2011;21(5):266-73.
61. Ruffin M, Volland M, Marie S, Bonora M, Blanchard E, Blouquit-Laye S, et al. Anoctamin 1 dysregulation alters bronchial epithelial repair in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 1 déc 2013;1832(12):2340-51.
62. Sun YH, Reid B, Fontaine JH, Miller LA, Hyde DM, Mogilner A, et al. Airway epithelial wounds in rhesus monkey generate ionic currents that guide cell migration to promote healing. *J Appl Physiol*. oct 2011;111(4):1031-41.
63. Dong J, Jiang X, Zhang X, Liu KS, Zhang J, Chen J, et al. Dynamically Regulated CFTR Expression and Its Functional Role in Cutaneous Wound Healing. *J Cell Physiol*. 2015;230(9):2049-58.
64. Amaral MD, Quaresma MC, Pankonien I. What Role Does CFTR Play in Development, Differentiation, Regeneration and Cancer? *Int J Mol Sci*. 29 avr 2020;21(9):3133.
65. Itokazu Y, Pagano RE, Schroeder AS, O'Grady SM, Limper AH, Marks DL. Reduced GM1 ganglioside in CFTR-deficient human airway cells results in decreased  $\beta$ 1-integrin signaling and delayed wound repair. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 1 mai 2014;306(9):C819-30.
66. Peitzman ER, Zaidman NA, Maniak PJ, O'Grady SM. Agonist binding to  $\beta$ -adrenergic receptors on human airway epithelial cells inhibits migration and wound repair. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 15 déc 2015;309(12):C847-55.

67. Mroz MS, Lajczak NK, Goggins BJ, Keely S, Keely SJ. The bile acids, deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid, regulate colonic epithelial wound healing. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* mars 2018;314(3):G378-87.
68. Chen J, Chen Y, Chen Y, Yang Z, You B, Ruan YC, et al. Epidermal CFTR Suppresses MAPK/NF- $\kappa$ B to Promote Cutaneous Wound Healing. *Cell Physiol Biochem.* 7 nov 2016;39(6):2262-74.
69. Matos AM, Pinto FR, Barros P, Amaral MD, Pepperkok R, Matos P. Inhibition of calpain 1 restores plasma membrane stability to pharmacologically rescued Phe508del-CFTR variant. *J Biol Chem.* 6 sept 2019;294(36):13396-410.
70. Sorio C, Montresor A, Bolomini-Vittori M, Caldrier S, Rossi B, Dusi S, et al. Mutations of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Cause a Monocyte-Selective Adhesion Deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 mai 2016;193(10):1123-33.
71. Shteinberg M, Haq IJ, Polineni D, Davies JC. Cystic fibrosis. *Lancet Lond Engl.* 5 juin 2021;397(10290):2195-211.
72. Rapport de données annuel du Registre canadien sur la fibrose kystique 2021.
73. Rozen R, De Braekeleer M, Daigneault J, Ferreira-Rajabi L, Gerdes M, Lamoureux L, et al. Cystic fibrosis mutations in French Canadians: three CFTR mutations are relatively frequent in a Quebec population with an elevated incidence of cystic fibrosis. *Am J Med Genet.* 1 févr 1992;42(3):360-4.
74. Jeukens J, Freschi L, Kukavica-Ibrulj I, Emond-Rheault JG, Allard C, Barbeau J, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* Population among Cystic Fibrosis Patients in Quebec, Canada: a Disease Hot Spot without Known Epidemic Isolates. *J Clin Microbiol.* 24 mai 2019;57(6):e02019-18.
75. ANDERSEN DH. CYSTIC FIBROSIS OF THE PANCREAS AND ITS RELATION TO CELIAC DISEASE: A CLINICAL AND PATHOLOGIC STUDY. *Am J Dis Child.* 1 août 1938;56(2):344-99.
76. Scotet V, L'Hostis C, Férec C. The Changing Epidemiology of Cystic Fibrosis: Incidence, Survival and Impact of the CFTR Gene Discovery. *Genes.* 26 mai 2020;11(6):589.
77. Savant A, Lyman B, Bojanowski C, Upadia J. Cystic Fibrosis. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., éditeurs. *GeneReviews*<sup>®</sup> [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 4 avr 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250/>
78. Fibrose kystique Canada [Internet]. [cité 1 avr 2023]. Disponible sur: <https://www.cysticfibrosis.ca/fr>

79. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. *Science*. 8 sept 1989;245(4922):1073-80.
80. Cystic Fibrosis Mutation Database: Statistics [Internet]. [cité 1 avr 2023]. Disponible sur: <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>
81. Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, Houck SA, Cai Z, Peters KW, et al. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell*. 1 févr 2016;27(3):424-33.
82. Boyle MP, De Boeck K. A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Respir Med*. 1 avr 2013;1(2):158-63.
83. Pranke I, Golec A, Hinzpeter A, Edelman A, Sermet-Gaudelus I. Emerging Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. From Gene Editing to Personalized Medicine. *Front Pharmacol*. 27 févr 2019;10:121.
84. Barrio R. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Cystic fibrosis-related diabetes: novel pathogenic insights opening new therapeutic avenues. *Eur J Endocrinol*. 1 avr 2015;172(4):R131-41.
85. Zielenski J. Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. *Respiration*. 2000;67(2):117-33.
86. Fanen P, Wohlhuter-Haddad A, Hinzpeter A. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *Int J Biochem Cell Biol*. 1 juill 2014;52:94-102.
87. Yeh J, Yu Y, Hwang T. Structural mechanisms for defective CFTR gating caused by the Q1412X mutation, a severe Class VI pathogenic mutation in cystic fibrosis. *J Physiol*. 15 janv 2019;597(2):543-60.
88. Sosnay PR, White TB, Farrell PM, Ren CL, Derichs N, Howenstine MS, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis in Nonscreened Populations. *J Pediatr*. 1 févr 2017;181:S52-S57.e2.
89. Tomashefski JF, Christoforidis AJ, Abdullah AK. Cystic Fibrosis in Young Adults: An Overlooked Diagnosis, with Emphasis on Pulmonary Function and Radiological Patterns. *Chest*. 1 janv 1970;57(1):28-36.
90. Coverstone AM, Ferkol TW. Early Diagnosis and Intervention in Cystic Fibrosis: Imagining the Unimaginable. *Front Pediatr*. 11 janv 2021;8:608821.
91. De Boeck K, Vermeulen F, Dupont L. The diagnosis of cystic fibrosis. *Presse Médicale*. 1 juin 2017;46(6, Part 2):e97-108.

92. Leniček Krleža J, Aralica M, Tješić-Drinković D, Crneković K, Culej J, Fressl Juroš G, et al. National Guidelines for the Performance of the Sweat Test in Diagnosis of Cystic Fibrosis on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine and the Cystic Fibrosis Centre - Paediatrics and adults, University Hospital Centre Zagreb. *Biochem Medica*. 15 févr 2022;32(1):010501.
93. Cimbalo C, Tosco A, Terlizzi V, Sepe A, Castaldo A, Salvadori L, et al. Elevated sweat chloride test: is it always cystic fibrosis? *Ital J Pediatr*. 14 mai 2021;47(1):112.
94. Children's Hospital of Pittsburgh [Internet]. [cité 4 avr 2023]. Cystic Fibrosis Symptoms & Treatment | Children's Pittsburgh. Disponible sur: <https://www.chp.edu/our-services/transplant/liver/education/liver-disease-states/cystic-fibrosis>
95. Castaldo A, Cimbalo C, Castaldo RJ, D'Antonio M, Scorza M, Salvadori L, et al. Cystic Fibrosis-Screening Positive Inconclusive Diagnosis: Newborn Screening and Long-Term Follow-Up Permits to Early Identify Patients with CFTR-Related Disorders. *Diagnostics*. 8 août 2020;10(8):570.
96. Mak DYF, Sykes J, Stephenson AL, Lands LC. The benefits of newborn screening for cystic fibrosis: The Canadian experience. *J Cyst Fibros*. 1 mai 2016;15(3):302-8.
97. Tluczek A, Orland KM, Cavanagh L. Psychosocial Consequences of False-Positive Newborn Screens for Cystic Fibrosis. *Qual Health Res*. 1 févr 2011;21(2):174-86.
98. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr*. 1 févr 2017;181:S4-S15.e1.
99. Minso R, Schulz A, Dopfer C, Alfeis N, van Barneveld A, Makartian-Gyulumyan L, et al. Intestinal current measurement and nasal potential difference to make a diagnosis of cases with inconclusive CFTR genetics and sweat test. *BMJ Open Respir Res*. 5 oct 2020;7(1):e000736.
100. López-Valdez JA, Aguilar-Alonso LA, Gándara-Quezada V, Ruiz-Rico GE, Ávila-Soledad JM, Reyes AA, et al. Cystic fibrosis: current concepts. *Bol Méd Hosp Infant México* [Internet]. 2021 [cité 4 avr 2023];78(6). Disponible sur: [https://www.bmhim.com/frame\\_esp.php?id=279](https://www.bmhim.com/frame_esp.php?id=279)
101. Miller AC, Comellas AP, Hornick DB, Stoltz DA, Cavanaugh JE, Gerke AK, et al. Cystic fibrosis carriers are at increased risk for a wide range of cystic fibrosis-related conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21 janv 2020;117(3):1621-7.
102. Polgreen PM, Comellas AP. Clinical Phenotypes of Cystic Fibrosis Carriers. *Annu Rev Med*. 27 janv 2022;73:563-74.
103. Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet*. janv 2015;16(1):45-56.

104. Bell SC, Mall MA, Gutierrez H, Macek M, Madge S, Davies JC, et al. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir Med*. 1 janv 2020;8(1):65-124.
105. Galante G, Freeman AJ. Gastrointestinal, Pancreatic, and Hepatic Manifestations of Cystic Fibrosis in the Newborn. *NeoReviews*. 1 janv 2019;20(1):e12-24.
106. Vélez C, Freedman SD, Assis DN. Update in Advancing the Gastrointestinal Frontier in Cystic Fibrosis. *Clin Chest Med*. 1 déc 2022;43(4):743-55.
107. J Burton S, Hachem C, Abraham JM. Luminal Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis. *Curr Gastroenterol Rep*. 23 mars 2021;23(3):4.
108. Gabel ME, Galante GJ, Freedman SD. Gastrointestinal and Hepatobiliary Disease in Cystic Fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*. déc 2019;40(6):825-41.
109. Colomba J, Boudreau V, Lehoux-Dubois C, Desjardins K, Coriati A, Tremblay F, et al. The main mechanism associated with progression of glucose intolerance in older patients with cystic fibrosis is insulin resistance and not reduced insulin secretion capacity. *J Cyst Fibros*. 1 juill 2019;18(4):551-6.
110. Singh VK, Schwarzenberg SJ. Pancreatic insufficiency in Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros*. 1 nov 2017;16:S70-8.
111. Dana J, Girard M, Debray D. Hepatic manifestations of cystic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol*. mai 2020;36(3):192.
112. Granados A, Chan CL, Ode KL, Moheet A, Moran A, Holl R. Cystic fibrosis related diabetes: Pathophysiology, screening and diagnosis. *J Cyst Fibros*. 1 oct 2019;18:S3-9.
113. Chedevergne F, Sermet-Gaudelus I. Prevention of osteoporosis in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. nov 2019;25(6):660.
114. Bieniek JM, Lapin CD, Jarvi KA. Genetics of CFTR and male infertility. *Transl Androl Urol*. mars 2021;10(3):1391-400.
115. Phillipson G. Cystic fibrosis and reproduction. *Reprod Fertil Dev*. 1998;10(1):113-9.
116. Hughan KS, Daley T, Rayas MS, Kelly A, Roe A. Female reproductive health in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 1 oct 2019;18:S95-104.
117. Guta MT, Tekalign T, Awoke N, Fite RO, Dendir G, Lenjebo TL. Global Burden of Anxiety and Depression among Cystic Fibrosis Patient: Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Chronic Dis*. 7 juill 2021;2021:6708865.
118. Haq IJ, Gray MA, Garnett JP, Ward C, Brodliie M. Airway surface liquid homeostasis in cystic fibrosis: pathophysiology and therapeutic targets. *Thorax*. 1 mars 2016;71(3):284-7.

119. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*. 1 mars 2002;109(5):571-7.
120. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol*. déc 2012;10(12):841-51.
121. Moreau-Marquis S, Stanton BA, O'Toole GA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. A short review. *Pulm Pharmacol Ther*. août 2008;21(4):595-9.
122. Green HD, Jones AM. Managing Pulmonary Infection in Adults With Cystic Fibrosis: Adult Cystic Fibrosis Series. *Chest*. 1 juill 2022;162(1):66-75.
123. Fischer AJ, Singh SB, LaMarche MM, Maakestad LJ, Kienenberger ZE, Peña TA, et al. Sustained Coinfections with *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 févr 2021;203(3):328-38.
124. Fugère A, Lalonde Séguin D, Mitchell G, Déziel E, Dekimpe V, Cantin AM, et al. Interspecific Small Molecule Interactions between Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from Adult Cystic Fibrosis Patients. *PLoS ONE*. 23 janv 2014;9(1):e86705.
125. Limoli DH, Yang J, Khansaheb MK, Helfman B, Peng L, Stecenko AA, et al. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* co-infection is associated with cystic fibrosis-related diabetes and poor clinical outcomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1 juin 2016;35(6):947-53.
126. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest*. 1 févr 2002;109(3):317-25.
127. Dobay O, Laub K, Stercz B, Kéri A, Balázs B, Tóthpál A, et al. Bicarbonate Inhibits Bacterial Growth and Biofilm Formation of Prevalent Cystic Fibrosis Pathogens. *Front Microbiol*. 19 sept 2018;9:2245.
128. Muggeo A, Coraux C, Guillard T. Current concepts on *Pseudomonas aeruginosa* interaction with human airway epithelium. *PLOS Pathog*. 30 mars 2023;19(3):e1011221.
129. Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiol Spectr*. févr 2018;6(1):10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018.
130. Chalmers SJ, Wylam ME. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection and Treatment Options. In: Ji Y, éditeur. *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols: Cutting-Edge Technologies and Advancements* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2020 [cité 28 juin 2023]. p. 229-51. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9849-4\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9849-4_16)

131. Wolter DJ, Emerson JC, McNamara S, Buccat AM, Qin X, Cochrane E, et al. Staphylococcus aureus Small-Colony Variants Are Independently Associated With Worse Lung Disease in Children With Cystic Fibrosis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 août 2013;57(3):384-91.
132. Cohen RWF, Folescu TW, Daltro P, Boechat MCB, Lima DF, Marques EA, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in cystic fibrosis patients: do we need to care? A cohort study. *São Paulo Med J.* 21 août 2017;135(5):420-7.
133. Suwantararat N, Rubin M, Bryan L, Tekle T, Boyle MP, Carroll KC, et al. Frequency of small-colony variants and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1 avr 2018;90(4):296-9.
134. Liao C, Huang X, Wang Q, Yao D, Lu W. Virulence Factors of Pseudomonas Aeruginosa and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Front Cell Infect Microbiol.* 6 juill 2022;12:926758.
135. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in Pseudomonas aeruginosa. *Protein Cell.* janv 2015;6(1):26-41.
136. Ruffin M, Brochiero E. Repair Process Impairment by Pseudomonas aeruginosa in Epithelial Tissues: Major Features and Potential Therapeutic Avenues. *Front Cell Infect Microbiol.* 31 mai 2019;9:182.
137. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 1 janv 2019;37(1):177-92.
138. Bonyadi P, Saleh NT, Dehghani M, Yamini M, Amini K. Prevalence of antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis infection: A systematic review and meta-analysis. *Microb Pathog.* 1 avr 2022;165:105461.
139. Stölting H, Lloyd CM. Pseudomonas aeruginosa: a pathogen making itself at home. *Trends Immunol.* 1 juill 2022;43(7):497-9.
140. Le Gars M, Descamps D, Roussel D, Sausseureau E, Guillot L, Ruffin M, et al. Neutrophil Elastase Degrades Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator via Calpains and Disables Channel Function In Vitro and In Vivo. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 janv 2013;187(2):170-9.
141. Levine SJ. Bronchial epithelial cell-cytokine interactions in airway inflammation. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res.* juin 1995;43(3):241-9.
142. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev.* 2000;173(1):27-38.

143. Courtney JM, Ennis M, Elborn JS. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 1 déc 2004;3(4):223-31.
144. Maillé E, Trinh NTN, Privé A, Bilodeau C, Bissonnette É, Grandvaux N, et al. Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF- $\alpha$  after injury. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* déc 2011;301(6):L945-55.
145. Roesch EA, Nichols DP, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis: An update. *Pediatr Pulmonol.* 2018;53(S3):S30-50.
146. Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet Lond Engl.* 19 nov 2016;388(10059):2519-31.
147. Adam D, Bilodeau C, Sognigbé L, Maillé É, Ruffin M, Brochiero E. CFTR rescue with VX-809 and VX-770 favors the repair of primary airway epithelial cell cultures from patients with class II mutations in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts. *J Cyst Fibros.* nov 2018;17(6):705-14.
148. Maillé É, Ruffin M, Adam D, Messaoud H, Lafayette SL, McKay G, et al. Quorum Sensing Down-Regulation Counteracts the Negative Impact of *Pseudomonas aeruginosa* on CFTR Channel Expression, Function and Rescue in Human Airway Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 10 nov 2017;7:470.
149. Trinh NTN, Bilodeau C, Maillé É, Ruffin M, Quintal MC, Desrosiers MY, et al. Deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and rescue in airway epithelial cells. *Eur Respir J.* 1 juin 2015;45(6):1590-602.
150. Ruffin M, Bilodeau C, Maillé É, LaFayette SL, McKay GA, Trinh NTN, et al. Quorum-sensing inhibition abrogates the deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* on airway epithelial repair. *FASEB J.* sept 2016;30(9):3011-25.
151. Rubino R, Bezzerri V, Favia M, Facchini M, Tebon M, Singh AK, et al. *Pseudomonas aeruginosa* reduces the expression of CFTR via post-translational modification of NHERF1. *Pflug Arch - Eur J Physiol.* 1 déc 2014;466(12):2269-78.
152. Jeffery Marano R, Jane Wallace H, Wijeratne D, William Fear M, San Wong H, O'Handley R. Secreted biofilm factors adversely affect cellular wound healing responses in vitro. *Sci Rep.* 17 août 2015;5(1):13296.
153. Valera FCP, Ruffin M, Adam D, Maillé É, Ibrahim B, Berube J, et al. *Staphylococcus aureus* impairs sinonasal epithelial repair: Effects in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and control subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 1 févr 2019;143(2):591-603.e3.
154. Vickery TW, Ramakrishnan VR, Suh JD. The Role of *Staphylococcus aureus* in Patients with Chronic Sinusitis and Nasal Polyposis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 11 mars 2019;19(4):21.

155. Putra I, Rabiee B, Anwar KN, Gidfar S, Shen X, Babalooee M, et al. Staphylococcus aureus Alpha-Hemolysin Impairs Corneal Epithelial Wound Healing and Promotes Intracellular Bacterial Invasion. *Exp Eye Res.* avr 2019;181:263-70.
156. Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J Pathol.* 2007;211(3):340-50.
157. Pankonien I, Quaresma MC, Rodrigues CS, Amaral MD. CFTR, Cell Junctions and the Cytoskeleton. *Int J Mol Sci.* 28 févr 2022;23(5):2688.
158. Collin AM, Lecocq M, Detry B, Carlier FM, Bouzin C, de Sany P, et al. Loss of ciliated cells and altered airway epithelial integrity in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 1 nov 2021;20(6):e129-39.
159. Castellani S, Favia M, Guerra L, Carbone A, Abbattiscianni AC, Di Gioia S, et al. Emerging relationship between CFTR, actin and tight junction organization in cystic fibrosis airway epithelium. *Histol Histopathol.* mai 2017;32(5):445-59.
160. Chmiel JF, Konstan MW, Elborn JS. Antibiotic and Anti-Inflammatory Therapies for Cystic Fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* oct 2013;3(10):a009779.
161. Ghigo A, Prono G, Riccardi E, De Rose V. Dysfunctional Inflammation in Cystic Fibrosis Airways: From Mechanisms to Novel Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci.* 16 févr 2021;22(4):1952.
162. Mogayzel PJ, Naureckas ET, Robinson KA, Mueller G, Hadjiliadis D, Hoag JB, et al. Cystic Fibrosis Pulmonary Guidelines. *Am J Respir Crit Care Med.* avr 2013;187(7):680-9.
163. Nevitt SJ, Thornton J, Murray CS, Dwyer T. Inhaled mannitol for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 9 févr 2018;2018(2):CD008649.
164. Galietta LJV. TMEM16A (ANO1) as a therapeutic target in cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol.* 1 juin 2022;64:102206.
165. Gorrieri G, Zara F, Scudieri P. SLC26A9 as a Potential Modifier and Therapeutic Target in Cystic Fibrosis Lung Disease. *Biomolecules.* 25 janv 2022;12(2):202.
166. Mall MA. ENaC inhibition in cystic fibrosis: potential role in the new era of CFTR modulator therapies. *Eur Respir J.* 24 déc 2020;56(6):2000946.
167. National Jewish Health [Internet]. 2019 [cité 26 juin 2023]. Cystic Fibrosis: Life Expectancy. Disponible sur: <https://nationaljewish.org/conditions/cystic-fibrosis-cf/life-expectancy>
168. Brownell JN, Bashaw H, Stallings VA. Growth and Nutrition in Cystic Fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med.* déc 2019;40(6):775-91.

169. Wouthuyzen-Bakker M, Bodewes FAJA, Verkade HJ. Persistent fat malabsorption in cystic fibrosis; lessons from patients and mice. *J Cyst Fibros*. 1 mai 2011;10(3):150-8.
170. Morrell MR, Kiel SC, Pilewski JM. Organ Transplantation for Cystic Fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*. déc 2019;40(6):842-56.
171. Lee JA, Cho A, Huang EN, Xu Y, Quach H, Hu J, et al. Gene therapy for cystic fibrosis: new tools for precision medicine. *J Transl Med*. 30 oct 2021;19:452.
172. Drug Development Pipeline [Internet]. [cité 21 avr 2023]. Disponible sur: <https://www.cff.org/Trials/Pipeline>
173. Bardin P, Sonnevile F, Tabary O. Mucoviscidose : dans la ligne des miR. *médecine/sciences*. 1 juin 2018;34(6-7):554-62.
174. Despotes KA, Donaldson SH. Current state of CFTR modulators for treatment of Cystic Fibrosis. *Curr Opin Pharmacol*. 1 août 2022;65:102239.
175. Pranke IM, Varilh J, Hatton A, Faucon C, Girodon E, Dreano E, et al. The U UGA C sequence provides a favorable context to ELX-02 induced CFTR readthrough. *J Cyst Fibros* [Internet]. 16 nov 2022 [cité 21 avr 2023]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569199322013923>
176. Kerem E. ELX-02: an investigational read-through agent for the treatment of nonsense mutation-related genetic disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 1 déc 2020;29(12):1347-54.
177. Poel E de, Spelier S, Suen SWF, Kruisselbrink E, Graeber SY, Mall MA, et al. Functional Restoration of CFTR Nonsense Mutations in Intestinal Organoids. *J Cyst Fibros*. 1 mars 2022;21(2):246-53.
178. Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front Pharmacol* [Internet]. 21 févr 2020 [cité 30 avr 2023];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.01662/full>
179. Bengtson C, Silswal N, Baumlin N, Yoshida M, Dennis J, Yerrathota S, et al. The CFTR Amplifier Nesolicaftor Rescues TGF- $\beta$ 1 Inhibition of Modulator-Corrected F508del CFTR Function. *Int J Mol Sci*. 19 sept 2022;23(18):10956.
180. Stephenson AL, Swaleh S, Sykes J, Stanojevic S, Ma X, Quon BS, et al. Contemporary cystic fibrosis incidence rates in Canada and the United States. *J Cyst Fibros* [Internet]. 10 nov 2022 [cité 1 avr 2023]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156919932201390X>
181. Gifford AH, Mayer-Hamblett N, Pearson K, Nichols DP. ANSWERING THE CALL TO ADDRESS CYSTIC FIBROSIS TREATMENT BURDEN IN THE ERA OF HIGHLY EFFECTIVE CFTR MODULATOR THERAPY. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc*. sept 2020;19(5):762-7.

182. Goetz DM, Savant AP. Review of CFTR modulators 2020. *Pediatr Pulmonol.* 2021;56(12):3595-606.
183. Bierlaagh MC, Muilwijk D, Beekman JM, van der Ent CK. A new era for people with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr.* 2021;180(9):2731-9.
184. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P, et al. A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation. *N Engl J Med.* 3 nov 2011;365(18):1663-72.
185. George A, Smith B, Sawicki GS, Goetz DM. Survey of patients with cystic fibrosis and caregivers decisions regarding CFTR modulators. *Pediatr Pulmonol.* 2020;55(11):2983-9.
186. McKinzie CJ, Goralski JL, Noah TL, Retsch-Bogart GZ, Prieur MB. Worsening anxiety and depression after initiation of lumacaftor/ivacaftor combination therapy in adolescent females with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 1 juill 2017;16(4):525-7.
187. Laselva O, Bartlett C, Gunawardena TNA, Ouyang H, Eckford PDW, Moraes TJ, et al. Rescue of multiple class II CFTR mutations by elexacaftor+tezacaftor+ivacaftor mediated in part by the dual activities of elexacaftor as both corrector and potentiator. *Eur Respir J.* 17 juin 2021;57(6):2002774.
188. Bear CE. A Therapy for Most with Cystic Fibrosis. *Cell.* 23 janv 2020;180(2):211.
189. Shaughnessy CA, Zeitlin PL, Bratcher PE. Elexacaftor is a CFTR potentiator and acts synergistically with ivacaftor during acute and chronic treatment. *Sci Rep.* 6 oct 2021;11:19810.
190. Barry PJ, Mall MA, Álvarez A, Colombo C, de Winter-de Groot KM, Fajac I, et al. Triple Therapy for Cystic Fibrosis Phe508del–Gating and –Residual Function Genotypes. *N Engl J Med.* 26 août 2021;385(9):815-25.
191. Nichols DP, Paynter AC, Heltshe SL, Donaldson SH, Frederick CA, Freedman SD, et al. Clinical Effectiveness of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in People with Cystic Fibrosis: A Clinical Trial. *Am J Respir Crit Care Med.* mars 2022;205(5):529-39.
192. Stapleton AL, Kimple AJ, Goralski JL, Nouraiie SM, Branstetter BF, Shaffer AD, et al. Elexacaftor-Tezacaftor- Ivacaftor improves sinonasal outcomes in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 1 sept 2022;21(5):792-9.
193. Griese M, Costa S, Linnemann RW, Mall MA, McKone EF, Polineni D, et al. Safety and Efficacy of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor for 24 Weeks or Longer in People with Cystic Fibrosis and One or More F508del Alleles: Interim Results of an Open-Label Phase 3 Clinical Trial. *Am J Respir Crit Care Med.* févr 2021;203(3):381-5.
194. Sutharsan S, McKone EF, Downey DG, Duckers J, MacGregor G, Tullis E, et al. Efficacy and safety of elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor versus tezacaftor plus ivacaftor in people

with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: a 24-week, multicentre, randomised, double-blind, active-controlled, phase 3b trial. *Lancet Respir Med*. 1 mars 2022;10(3):267-77.

195. Zemanick ET, Taylor-Cousar JL, Davies J, Gibson RL, Mall MA, McKone EF, et al. A Phase 3 Open-Label Study of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in Children 6 through 11 Years of Age with Cystic Fibrosis and at Least One F508del Allele. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 juin 2021;203(12):1522-32.
196. Kapouni N, Moustaki M, Douros K, Loukou I. Efficacy and Safety of Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor in the Treatment of Cystic Fibrosis: A Systematic Review. *Children*. 15 mars 2023;10(3):554.
197. Goralski JL, Hoppe JE, Mall MA, McColley SA, McKone E, Ramsey B, et al. Phase 3 Open-Label Clinical Trial of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in Children Aged 2 Through 5 Years with Cystic Fibrosis and at Least One F508del Allele. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 15 mars 2023 [cité 20 avr 2023]; Disponible sur: <https://www.atsjournals.org/doi/10.1164/rccm.202301-0084OC>
198. FDA Approves Trikafta for Children Ages 2 Through 5 Years With Certain CF Mutations | Cystic Fibrosis Foundation [Internet]. 2023 [cité 26 avr 2023]. Disponible sur: <https://www.cff.org/news/2023-04/trikafta-approval-ages-2-5-mutations>
199. Burgel PR, Sermet-Gaudelus I, Durieu I, Kanaan R, Macey J, Grenet D, et al. The French Compassionate Program of elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor in people with cystic fibrosis with advanced lung disease and no F508del CFTR variant. *Eur Respir J* [Internet]. 1 janv 2023 [cité 20 avr 2023]; Disponible sur: <https://erj.ersjournals.com/content/early/2023/02/09/13993003.02437-2022>
200. Milo F, Ciciriello F, Alghisi F, Tabarini P. Lived experiences of people with cystic fibrosis that were not eligible for elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor (ETI): A qualitative study. *J Cyst Fibros* [Internet]. 20 déc 2022 [cité 20 avr 2023]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156919932201428X>
201. Stashower J, Carr P, Miller V, Zlotoff B. Novel reaction to new cystic fibrosis medication Trikafta. *Clin Case Rep*. 4 mai 2021;9(5):e04116.
202. Petersen MC, Begnel L, Wallendorf M, Litvin M. Effect of elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor on body weight and metabolic parameters in adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 1 mars 2022;21(2):265-71.
203. Wisniewski BL, Aylward SC, Jordan CO, Kopp BT, Paul GR. Hypervitaminosis A with fulminant secondary intracranial hypertension following personalized medicine-based Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor initiation in a preadolescent with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 1 mai 2022;21(3):e217-20.

204. Zhang L, Albon D, Jones M, Bruschwein H. Impact of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor on depression and anxiety in cystic fibrosis. *Ther Adv Respir Dis.* 23 déc 2022;16:17534666221144212.
205. Tindell W, Su A, Oros SM, Rayapati AO, Rakesh G. Trikafta and Psychopathology in Cystic Fibrosis: A Case Report. *Psychosomatics.* 1 nov 2020;61(6):735-8.
206. Spoletini G, Gillgrass L, Pollard K, Shaw N, Williams E, Etherington C, et al. Dose adjustments of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in response to mental health side effects in adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 1 nov 2022;21(6):1061-5.
207. Heo S, Young DC, Safirstein J, Bourque B, Antell MH, Diloreto S, et al. Mental status changes during elexacaftor/tezacaftor / ivacaftor therapy. *J Cyst Fibros.* 1 mars 2022;21(2):339-43.
208. Davies JC, Moskowitz SM, Brown C, Horsley A, Mall MA, McKone EF, et al. VX-659-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N Engl J Med.* 25 oct 2018;379(17):1599-611.
209. Uluer AZ, MacGregor G, Azevedo P, Indihar V, Keating C, Mall MA, et al. Safety and efficacy of vanzacaftor–tezacaftor–deutivacaftor in adults with cystic fibrosis: randomised, double-blind, controlled, phase 2 trials. *Lancet Respir Med* [Internet]. 23 févr 2023 [cité 20 avr 2023]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213260022005045>
210. Mésinè J, Ruffin M, Guillot L, Corvol H. Modifier Factors of Cystic Fibrosis Phenotypes: A Focus on Modifier Genes. *Int J Mol Sci.* 17 nov 2022;23(22):14205.
211. Stanton BA, Coutermarsh B, Barnaby R, Hogan D. *Pseudomonas aeruginosa* Reduces VX-809 Stimulated F508del-CFTR Chloride Secretion by Airway Epithelial Cells. *PLoS ONE.* 27 mai 2015;10(5):e0127742.
212. Laselva O, Conese M. Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor Accelerates Wound Repair in Cystic Fibrosis Airway Epithelium. *J Pers Med.* 25 sept 2022;12(10):1577.
213. Mall M, Wissner A, Schreiber R, Kuehr J, Seydewitz HH, Brandis M, et al. Role of KVLQT1 in Cyclic Adenosine Monophosphate–Mediated Cl<sup>-</sup> Secretion in Human Airway Epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* sept 2000;23(3):283-9.
214. Bell SC, De Boeck K, Amaral MD. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls. *Pharmacol Ther.* 1 janv 2015;145:19-34.
215. Chen L, Peng G, Comollo TW, Zou X, Sampson KJ, Larsson HP, et al. Two small-molecule activators share similar effector sites in the KCNQ1 channel pore but have distinct effects on voltage sensor movements. *Front Physiol.* 25 juill 2022;13:903050.

216. Zou X, Wu X, Sampson KJ, Colecraft HM, Larsson HP, Kass RS. Pharmacological rescue of specific long QT variants of KCNQ1/KCNE1 channels. *Front Physiol.* 23 nov 2022;13:902224.
217. Willegems K, Eldstrom J, Kyriakis E, Ataei F, Sahakyan H, Dou Y, et al. Structural and electrophysiological basis for the modulation of KCNQ1 channel currents by ML277. *Nat Commun.* 29 juin 2022;13:3760.
218. Hou P, Shi J, White KM, Gao Y, Cui J. ML277 specifically enhances the fully activated open state of KCNQ1 by modulating VSD-pore coupling. *eLife.* 8:e48576.
219. Eldstrom J, McAfee DA, Dou Y, Wang Y, Fedida D. ML277 regulates KCNQ1 single-channel amplitudes and kinetics, modified by voltage sensor state. *J Gen Physiol.* 12 oct 2021;153(12):e202112969.
220. Beaudoin T, LaFayette S, Nguyen D, Rousseau S. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* caused by *muca* mutations result in activation of TLR2 in addition to TLR5 in airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 9 nov 2012;428(1):150-4.
221. Bilodeau C, Bardou O, Maillé É, Berthiaume Y, Brochiero E. Deleterious impact of hyperglycemia on cystic fibrosis airway ion transport and epithelial repair. *J Cyst Fibros.* 1 janv 2016;15(1):43-51.
222. Tarnowski BI, Spinale FG, Nicholson JH. DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. *Biotech Histochem Off Publ Biol Stain Comm.* 1991;66(6):297-302.
223. Blanchard AC, Waters VJ. Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. *Semin Respir Crit Care Med.* déc 2019;40(6):727-36.
224. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 2020;109(5):893-9.
225. Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov Today.* 1 janv 2019;24(1):350-9.
226. Lowy FD. Staphylococcus aureus Infections. *N Engl J Med.* 20 août 1998;339(8):520-32.
227. Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence.* 12(1):547-69.
228. Cott C, Thuenauer R, Landi A, Kühn K, Juillot S, Imberty A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB inhibits tissue repair processes by triggering  $\beta$ -catenin degradation. *Biochim Biophys Acta.* juin 2016;1863(6Part A):1106-18.
229. Hegggers JP, Haydon S, Ko F, Hayward PG, Carp S, Robson MC. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: its role in retardation of wound healing: the 1992 Lindberg Award. *J Burn Care Rehabil.* 1992;13(5):512-8.

230. Muller M. Premature cellular senescence induced by pyocyanin, a redox-active *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Free Radic Biol Med.* 1 déc 2006;41(11):1670-7.
231. Geiser TK, Kazmierczak BI, Garrity-Ryan LK, Matthay MA, Engel JN. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT inhibits in vitro lung epithelial wound repair. *Cell Microbiol.* 2001;3(4):223-36.
232. Hook AL, Flewellen JL, Dubern JF, Carabelli AM, Zaid IM, Berry RM, et al. Simultaneous Tracking of *Pseudomonas aeruginosa* Motility in Liquid and at the Solid-Liquid Interface Reveals Differential Roles for the Flagellar Stators. *mSystems.* 24 sept 2019;4(5):e00390-19.
233. Girault A, Chebli J, Privé A, Trinh NTN, Maillé E, Grygorczyk R, et al. Complementary roles of KCa3.1 channels and  $\beta$ 1-integrin during alveolar epithelial repair. *Respir Res.* 2015;16(1):100.
234. De Rose V, Molloy K, Gohy S, Pilette C, Greene CM. Airway Epithelium Dysfunction in Cystic Fibrosis and COPD. *Mediators Inflamm.* 8 avr 2018;2018:1309746.
235. Yu M, Selvaraj SK, Liang-Chu MMY, Aghajani S, Busse M, Yuan J, et al. A resource for cell line authentication, annotation and quality control. *Nature.* avr 2015;520(7547):307-11.
236. Zabner J, Karp P, Seiler M, Phillips SL, Mitchell CJ, Saavedra M, et al. Development of cystic fibrosis and noncystic fibrosis airway cell lines. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* mai 2003;284(5):L844-54.
237. Pedemonte N, Tomati V, Sondo E, Galietta LJV. Influence of cell background on pharmacological rescue of mutant CFTR. *Am J Physiol-Cell Physiol.* avr 2010;298(4):C866-74.
238. The Lancet Respiratory Medicine. Cystic fibrosis treatment: hope for all? *Lancet Respir Med.* 1 déc 2022;10(12):1099.
239. Ravi M, Paramesh V, Kaviya S r., Anuradha E, Solomon FDP. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *J Cell Physiol.* 2015;230(1):16-26.
240. Lledó-García E, Humanes-Sánchez B, Mojena-Sánchez M, Rodríguez JCJ, Hernández-Fernández C, Tejedor-Jorge A, et al. Independent Cellular Effects of Cold Ischemia and Reperfusion: Experimental Molecular Study. *Transplant Proc.* 1 avr 2013;45(3):1260-3.
241. LeSimple P, van Seuning I, Buisine MP, Copin MC, Hinz M, Hoffmann W, et al. Trefoil Factor Family 3 Peptide Promotes Human Airway Epithelial Ciliated Cell Differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* mars 2007;36(3):296-303.
242. Scopulovic L, Francis D, Pandzic E, Francis R. Quantifying cilia beat frequency using high-speed video microscopy: Assessing frame rate requirements when imaging different ciliated tissues. *Physiol Rep.* 8 juin 2022;10(11):e15349.

243. Thiagarajah JR, Song Y, Derichs N, Verkman AS. Airway surface liquid depth imaged by surface laser reflectance microscopy. *J Gen Physiol.* sept 2010;136(3):353-62.
244. Harvey PR, Tarran R, Garoff S, Myerburg MM. Measurement of the Airway Surface Liquid Volume with Simple Light Refraction Microscopy. *Am J Respir Cell Mol Biol.* sept 2011;45(3):592-9.
245. Gerckens M, Alsafadi HN, Wagner DE, Lindner M, Burgstaller G, Königshoff M. Generation of Human 3D Lung Tissue Cultures (3D-LTCs) for Disease Modeling. *JoVE J Vis Exp.* 12 févr 2019;(144):e58437.
246. Tabor DE, Yu L, Mok H, Tkaczyk C, Sellman BR, Wu Y, et al. Staphylococcus aureus Alpha-Toxin Is Conserved among Diverse Hospital Respiratory Isolates Collected from a Global Surveillance Study and Is Neutralized by Monoclonal Antibody MEDI4893. *Antimicrob Agents Chemother.* 22 août 2016;60(9):5312-21.