



Rôle des phospholipases C dans la régulation de la sécrétion d'ions chlorure et de l'homéostasie calcique dans les cellules épithéliales bronchiques : intérêt dans la mucoviscidose

Chloé Grebert

► To cite this version:

Chloé Grebert. Rôle des phospholipases C dans la régulation de la sécrétion d'ions chlorure et de l'homéostasie calcique dans les cellules épithéliales bronchiques : intérêt dans la mucoviscidose. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Poitiers, 2019. Français. NNT : 2019POIT2301 . tel-02492604

HAL Id: tel-02492604

<https://theses.hal.science/tel-02492604>

Submitted on 27 Feb 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale « *Sciences Biologiques & Santé* »

Secteur de Recherche : Physiologie et physiopathologie

Présentée par :

Chloé GREBERT

Rôle des phospholipases C dans la régulation de la sécrétion d'ions chlorure et de l'homéostasie calcique dans les cellules épithéliales bronchiques : intérêt dans la mucoviscidose

Directeur de Thèse : Dr. Clarisse VANDEBROUCK

Soutenue le 29 novembre 2019

devant la Commission d'Examen

JURY

Jean-François FAIVRE
Valérie URBACH
Olivier TABARY
Christelle GUIBERT
Bruno CONSTANTIN
Clarisse VANDEBROUCK

Professeur, Université de Poitiers
Chargée de recherches INSERM, Paris
Chargé de recherches INSERM, Paris
Directrice de recherches INSERM, Bordeaux
Directeur de recherches CNRS, Poitiers
Maître de Conférences, Université de Poitiers

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Remerciements

Je remercie le professeur Jean-François Faivre d'avoir accepté d'être le président du jury.

Je remercie les docteurs Valérie Urbach et Olivier Tabary d'avoir consenti à être les rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie également le docteur Christelle Guibert et le docteur Bruno Constantin de participer à ce jury de thèse en qualité d'examineurs.

J'aimerais remercier Clarisse Vandebrouck qui a rendu cette thèse possible, et pour les mille et un détails qui ont fait que cette thèse ait pu aboutir.

Je remercie chaleureusement l'association vaincre la mucoviscidose, qui a financé cette thèse et sans qui rien n'aurait été possible. C'est par elle et pour les patients que cette thèse a été écrite.

Je remercie aussi Frédéric Becq, directeur de l'équipe TIM, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour ses chouquettes, et pour m'avoir fait aimer les victoires de l'OM.

Un grand merci à Khadidja, qui m'a fait découvrir le labo et les secrets du western blot. Sa thèse fût mon livre de chevet, et surtout, elle m'a montré qu'on survit à la thèse.

Merci à Jodie, ma colocataire, ma camarade de thèse, ma pote : pour m'avoir écouté sans jamais me tuer, pour les beaux moments qu'on a partagés dans l'adversité pendant ces trois ans, et pour les soirées jeux.

Merci à Arnaud, pour sa bonne humeur et ses nombreux conseils pratiques qui permettent de ne pas rater la prochaine expérience (ou pas).

Une mention spéciale pour ma sœur jumelle Sandra, son humour désopilant et son amour sincère. Je ne vais pas en dire davantage car une BD sortira prochainement à partir de ses blagues que j'ai collectées. Elle s'intitulera : les tribulations de Sandra M. en salle de culture.

Un immense merci à Lionel pour sa disponibilité, la qualité de ses conseils scientifiques. Je lui dois le meilleur de cette thèse.

Merci à Manuella, toujours partante, pour son aide, sa joie de vivre, les soirées jeux.

Merci à Cristelle et Carole, pour leur aide, leur amitié et la bonne ambiance à la pause repas.

Merci à l'ensemble du laboratoire STIM, pour son accueil, pour l'ambiance qui était toujours très bonne. Merci à Amandine, Christophe, Stéphane, Christian, Thomas, Thierry, James, Jenny, Charles-Albert, Guenaëlle, Elodie, Audrey pour les moments de détente, rigolades et discussions.

Merci à Nicolas, pour ta patience, tes réconforts, ton amour.

Merci à ma famille, qui m'a toujours encouragée à prendre les choses du bon côté.

Merci à Margot, Ma Sœur (la vraie, cette fois) qui est absolument adorable et qui sait exactement de quels genres de bonbons j'ai besoin pendant les périodes de rédaction

Merci maman, pour tout ce que tu as toujours partagé avec nous.

Table des matières

TABLE DES MATIERES	1
ABRÉVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	9
INTRODUCTION	10
I. L'homéostasie calcique dans la mucoviscidose	10
A. La mucoviscidose : maladie génétique aux symptômes pulmonaires dramatiques	10
1. Des mutations de la protéine CFTR aux manifestations cliniques de la pathologie	11
2. Régulations de la protéine CFTR	13
B. Augmentation globale du Ca^{2+} dans la mucoviscidose	15
1. La régulation des canaux TRP est dysfonctionnelle dans la mucoviscidose	15
2. Autres anomalies de l'homéostasie calcique dans la mucoviscidose	17
C. Conséquences physiologiques de la dérégulation calcique	18
1. Régulation de CFTR par le Ca^{2+}	18
2. Inflammation et infection pulmonaire	24
3. Le Ca^{2+} favorise la sécrétion de fluides via l'activation des CaCC	26
II. Les phospholipases C	28
A. Structure	30
B. Distribution tissulaire	32
C. Principales fonctions physiologiques dans l'organisme	34
D. Voies d'activation	35
1. Les phospholipases C β	35
2. Les phospholipases C γ	36
3. Les phospholipases C δ	37
4. Les phospholipases C ϵ	38
5. Les phospholipases C ζ et η	38
E. Fonction des phospholipases C dans les voies respiratoires	39
1. Rôle des PLC dans la physiologie du poumon	39
2. Bronchopneumopathies chroniques obstructives, asthme et inflammation	39
III. Intérêt des phospholipases C dans la mucoviscidose	41
A. Les substrats et les produits de la réaction enzymatique des phospholipases C modulent le canal CFTR	41

1. La protéine kinase C -----	41
2. La protéine Epac (exchange protein directly activated by cAMP) -----	44
3. Le PIP ₂ -----	46
B. Les phospholipases C dans la sécrétion chlorure -----	48
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS -----	50
I. Exploration du rôle des PLC dans la sécrétion chlorure dépendante de CFTR	50
II. Étude de la régulation de l'influx calcique par les phospholipases C	50
MATERIEL ET METHODES -----	52
I. Culture cellulaire	52
A. Lignées 16HBE14o- et CFBE41o- -----	52
1. Milieux de culture -----	52
2. Entretien des lignées -----	52
B. Lignées CFBE-WT et CFBE-ΔF508 -----	53
1. Milieux de culture -----	53
2. Congélation et décongélation des lignées -----	53
C. Cellules humaines épithéliales respiratoires bronchiques (hAECB) -----	54
1. Milieux de culture -----	54
2. Caractéristiques des deux patients -----	54
3. Entretien -----	55
D. Culture de cellules polarisées -----	55
1. Culture Air/Liquide (ALI) -----	55
2. Culture Liquide/Liquide (LI) -----	56
II. Techniques de biologie cellulaire et de biochimie	56
A. Western blot -----	56
1. Principe -----	56
2. Lyse cellulaire et dosage des protéines -----	57
3. Gel d'électrophorèse et transfert sur membrane de nitrocellulose -----	57
4. Dépôt des Anticorps et révélation -----	60
B. Transfection de siRNA (small interfering RNA) -----	61
1. Principe -----	61
2. Protocole -----	61
III. Techniques de biologie et de physiologie cellulaire	63
A. Immunomarquage indirect -----	63
1. Principe -----	63
2. Protocole -----	63

B. Duolink -----	64
1. Principe -----	64
2. Protocole -----	64
C. Mesure du courant CFTR en chambre de Ussing -----	66
1. Principe -----	66
2. Mise en place du système -----	66
3. Protocoles utilisés -----	67
4. Applications -----	68
D. Mesure du Ca^{2+} intracellulaire -----	68
1. Principe -----	68
2. Protocole -----	69
RESULTATS -----	71
PARTIE I : Implication des phospholipases C dans le courant chlorure dépendant du CFTR dans les cellules épithéliales bronchiques CFBE-WT et CFBE-F508del corrigées -----	71
A. Contexte -----	71
B. Résumé de l'article -----	72
C. Article -----	75
D. Résultats complémentaires -----	100
1. Effet de l'inhibition pharmacologique des PLC après l'activation forskoline sur le courant CFTR-dépendant -----	100
2. Effet du DIDS sur le courant CFTR-dépendant dans les cellules CFBE-WT transfectées avec le siRNA PLC β 3 -----	102
3. Effet de l'inhibition des PKC sur le courant CFTR-dépendant dans les cellules CFBE-WT transfectées avec le siRNA PLC β 3 -----	103
4. Essais de stimulation de la PLC β 3 -----	104
PARTIE II : Implication des PLC dans l'influx calcique des cellules bronchiques épithéliales non CF et CF -----	107
A. Contexte -----	107
B. Résultats -----	107
1. Étude du rôle de la PLC δ 1 dans la régulation de l'influx calcique dans les cellules épithéliales bronchiques CF -----	107
2. Étude du rôle de la PLC γ 1 et de la PLC β 3 dans la régulation de l'influx calcique des cellules hAECB non CF et CF -----	111
3. Influx calcique dans les cellules hAECB non CF et CF : Résumé et conclusion -----	114
PARTIE III : Focus sur le rôle de la PLCδ1 dans la régulation de l'influx calcique des cellules épithéliales bronchiques -----	115
A. Contexte -----	115
B. Résultats -----	116

1. Etude de la localisation cellulaire des protéines TRPV6, PLC δ 1 et CFTR et de leur proximité dans les cellules épithéliales pulmonaires 16HBE14o- et CFBE41o- -----	116
2. Étude du complexe annexin 2-S100A10 dans la régulation de l'influx calcique des cellules épithéliales pulmonaires 16HBE14o- et CFBE41o- -----	119
3. Proximité entre les différents patenaires : Résumé et conclusion -----	122
CONCLUSION GENERALE -----	123
DISCUSSION ET PERSPECTIVES -----	124
PARTIE I : Exploration du rôle des PLC dans la sécrétion chlorure dépendante de CFTR -----	124
A. Les isoformes de PLC qui jouent un rôle dans la sécrétion chlorure dépendante de CFTR dans les cellules épithéliales bronchiques -----	124
1. L'inhibition pharmacologique des PLC par le composé U73122 diminue la stabilité du courant chlorure CFTR-dépendant au cours du temps -----	124
2. La diminution de l'expression de la PLC γ 1 ou de la PLC β 3 diminue l'activation maximale du courant chlorure CFTR-dépendant -----	125
B. Les différences observées entre l'effet siRNA et l'effet inhibition pharmacologique des PLC dans les cellules CFBE suggèrent que les PLC sont impliquées dans deux mécanismes différents pour favoriser la sécrétion chlorure -----	129
C. La PLC β 3 intervient dans l'activation des CaCC par l'UTP dans les cellules CFBE -----	131
PARTIE II : Étude de la régulation de l'influx calcique par les phospholipases C -----	133
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	137
ANNEXES -----	164
Article scientifique -----	164
Curriculum vitae -----	174

Abréviations

4- α PDD : 4 α -phorbol-12,13-didecanoate

16HBE14o- : human bronchial epithelial cell line

A

ABC : ATP binding cassette

ADN : acide désoxyriboribonucléique

ALI : culture air/liquide

AM : acétoxyméthyl ester

AMPK : AMP-activated protein kinase

APS : persulfate d'ammonium

ARNm : acide ribonucléique messenger

aSMC : airway smooth muscle cells

ATP : adenosine triphosphate

B

BCA : bicinchoninic acid assay

BHK : baby hamster kidney

BPCO : bronchopneumopathies chroniques obstructives

C

CaN : calcineurine

CF : cystic fibrosis

CFBE41o- : human cystic fibrosis bronchial epithelial cell line

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

COX-2 : cyclooxygénase 2

D

DIDS :

4'4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid

DMSO : diméthylsulfoxyde

DOC : aéoxycholate

E

EF-1 alpha : translational elongation factor-1 alpha

EGF : epidermal growth factor

Epac : exchange protein directly activated by cAMP

H

hAECB CF : cellules humaines épithéliales bronchiques primaires CF

hAECB non CF : cellules humaines épithéliales bronchiques non CF

I

IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine

IGF : insulin-like growth factor

IL-1 β : interleukine 1 β

IP₃ : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

K

KO : knock out

L

Li : culture liquide/liquid

LPA : acide lysophosphatidique

LPAR : lysophosphatidic acid receptor

LPS : lipopolysaccharide

M

MAP kinase : mitogen-activated protein kinase

mTOR : mechanistic target of rapamycin

N

NBD : nucleotide binding domain

NHBE : normal human bronchial epithelial cells

NHERF : Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor

NF-κB : nuclear factor kappa B

NKCC : Na-K-Cl cotransporter

O

OAG : 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol

ORAI : calcium release-activated calcium channel protein 1

ORCC : outwardly rectifying chloride channel

P

PAR₂ : protease-activated receptor 2

PBS : tampon phosphate salin

PDGF : platelet-derived growth factor

PDZ : post synaptic density-95, drosophila disc large tumor suppressor and zonula occludens-1 protein

PH : pleckstrin homology

PI : phosphatidylinositol

PI4P : phosphatidylinositol monophosphate

PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PKG : protéine kinase G

PKN : PKC-related kinases

PLA : proximity ligation assay

PLC : phospholipase C

PMCA : plasma membrane Ca²⁺ ATPase

PP2A : phosphatase 2A

PP2C : phosphatase 2C

Pyk2 : proline-rich tyrosine kinase 2

R

RCPG : récepteurs couplés aux protéines G

RISC : RNA-induced silencing complex

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROMK : renal outer medullary potassium channel

Rpm : rotation par minute

RTK : récepteur à activité tyrosine kinase

RVD : regulatory volume decrease

S

SCBN : nontransformed canine intestinal cell line

SERCA : sarco endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase

siRNA : small interfering RNA

Src : proto-oncogene tyrosine-protein kinase

T

TBS : solution saline tamponnée

TIM : triose-phosphate isomérase

TMD : transmembrane domain

TNFα : tumor necrosis factor

TRP : transient receptor potential

TRPC : transient receptor potential canonical

TRPM : transient receptor potential melastatin

TRPV : transient receptor potential vanilloïde

V

VIP : vasoactive intestinal peptide

Liste des figures

Figure 1 : Effet des différentes classes de mutation du gène codant pour le canal CFTR sur l'expression/fonction de la protéine -----	11
Figure 2 : Structure et principaux régulateurs de la protéine CFTR-WT-----	14
Figure 3 : Aperçu des canaux TRP qui sont dérégulés dans les cellules qui expriment la protéine CFTR-F508del -----	16
Figure 4 : Expression tissulaire des adénylate cyclases 1, 3, 8 et 9 analysée par le projet « The Human Protein Atlas » dans les principaux tissus qui expriment le canal CFTR -----	20
Figure 5 : Rôle du Ca^{2+} dans l'activation du canal CFTR -----	23
Figure 6 : L'assemblage intracellulaire de la mucine MUC5B -----	24
Figure 7 : Activation de la sécrétion d'eau par le Ca^{2+} intracellulaire -----	27
Figure 8 : Sites d'actions des différentes phospholipases sur les glycérophospholipides -----	28
Figure 9 : Schéma simplifié représentant la signalisation cellulaire impliquant les phospholipases C	30
Figure 10 : Domaines structuraux des six familles de PLC qui sont retrouvées chez les mammifères	31
Figure 11 : Expression tissulaire des protéines PLC δ 1, PLC δ 3, PLC δ 4, PLC ϵ , PLC η 1 et PLC η 2 analysée par le projet « The Human Protein Atlas » dans les organes qui expriment CFTR-----	33
Figure 12 : Expression tissulaire des protéines PLC β 1, PLC β 2, PLC β 3, PLC β 4, PLC γ 1 et PLC γ 2 analysée par le projet « The Human Protein Atlas » dans les organes qui expriment CFTR-----	33
Figure 13 : Auto-inhibition des phospholipases C : exemple avec la PLC β 2-----	35
Figure 14 : Activation des PLC γ par les récepteurs à activité tyrosine kinase : exemple avec la PLC γ 1	36
Figure 15 : Régulation des canaux TRP par les phospholipases activées par le Ca^{2+} -----	37
Figure 16 : Schéma représentant les acteurs cellulaires en lien avec les phospholipases C -----	41
Figure 17 : Structure des différentes isoformes de PKC-----	42
Figure 18 : Activation de la PKC par le DAG : exemple avec les PKC conventionnelles -----	43
Figure 19 : La protéine Epac contrôle l'homéostasie calcique cellulaire -----	45
Figure 20 : Cycle des phosphoinositides -----	48
Figure 21 : Représentation de l'interface air-liquide utilisée pour cultiver les cellules épithéliales pulmonaires bronchiques-----	55
Figure 22 : Protocole schématisé de la reverse transfection de siRNA sur inserts -----	62
Figure 23 : Principe de la technique de proximity ligation assay-----	64
Figure 24 : Représentation des deux protocoles utilisés au cours des expériences en chambre de Ussing -----	68
Figure 25 : Structure de la sonde Fluo-4-AM-----	69
Figure 26 : Paramètres mesurés au cours des expériences en chambre de Ussing -----	72
Figure 27 : Courant de court-circuit dépendant de l'activation du CFTR dans les lignées 16HBE14o-, CFBE-WT et CFBE-F508del en présence de l'inhibiteur de PLC U73122 ou de son analogue inactif.	101
Figure 28 : Effet du DIDS sur le courant CFTR-dépendant dans des cellules CFBE-WT transfectées avec un siRNA PLC β 3 -----	102

Figure 29 : Effet de l'inhibition des PKC sur les cellules CFBE-F508del corrigées et CFBE-WT, transfectées avec le siRNA PLCβ3-----	103
Figure 30 : Effet du traitement par l'actétylshikonine (AS) 1 μM pendant 24 h sur le courant CFTR-dépendant dans des cellules CFBE-WT -----	105
Figure 31 : Effet de l'acide lysophosphatidique (LPA) sur le courant CFTR-dépendant dans les 16HBE14o-----	106
Figure 32 : Effet du siRNA PLCδ1 sur l'influx calcique dans les cellules CFBE -----	108
Figure 33 : Effet du siRNA PLCδ1 sur l'influx calcique dans les cellules hAECB non CF et CF-----	110
Figure 34 : Contrôle de l'expression de la PLCβ3 et de la PLCγ1 dans les cellules hAECB non CF et CF au premier passage par western blot-----	111
Figure 35 : Effet des siRNA PLCγ1 et PLCβ3 sur l'influx calcique dans les cellules hAECB non CF-----	112
Figure 36 : Effet des siRNA PLCγ1 et PLCβ3 sur l'influx calcique dans les cellules hAECB CF-----	113
Figure 37 : Différences de régulation du canal TRPV6 impliquant la PLCδ1 entre une cellule non CF et une cellule CF -----	115
Figure 38 : Localisation cellulaire des trois protéines CFTR, TRPV6 et PLC-δ1 dans des cultures épithéliales bronchique polarisées saines (16HBE14o-) et mucoviscidosiques (CFBE41o-) -----	117
Figure 39 : Proximité entre CFTR, TRPV6 et PLCδ1 dans les cellules 16HBE14o- versus CFBE41o- obtenues par la technique de Proximity Ligation Assay -----	118
Figure 40 : Expression endogène des protéines S100A10 et annexin 2 dans les cellules 16HBE14o- et CFBE41o-----	120
Figure 41 : Proximité entre annexine 2, S100A10 et TRPV6 dans les cellules 16HBE14o- et CFBE41o-----	121
Figure 42 : Proximité entre annexine 2, S100A10, CFTR et PLCδ1 dans les cellules 16HBE14o- versus CFBE41o-----	122
Figure 43 : Schéma résumant les principales découvertes durant le projet de thèse : les PLC stimulent la sécrétion chlorure (A) et régulent l'influx calcique dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (B)-----	123
Figure 44 : Expression normalisée de la quantité d'ARN des 13 isoformes de PLC dans les lignées A549 et HBEC3-KT-----	125
Figure 45 : Partenaires communs entre CFTR et les phospholipases C identifiés dans la littérature	127
Figure 46 : Expression normalisée de la quantité d'ARN des protéines NHERF1, NHERF2 et SHANK2 dans les lignées A549 et HBEC3-KT-----	128
Figure 47 : Résumé des proximités étudiées par la méthode de proximity ligation assay entre la PLCδ1 et le canal TRPV6-----	136

Liste des tableaux

Tableau 1 : Informations concernant les deux donneurs de cellules hAECB primaires-----	54
Tableau 2 : Composition des tampons de lyse -----	57
Tableau 3 : Composition des tampons lower et upper 4x pour la réalisation des gels d'acrylamide --	58
Tableau 4 : Composition des gels d'acrylamide -----	58
Tableau 5 : Composition des gels d'acrylamide pour la protéine CFTR -----	58
Tableau 6 : Composition du tampon d'électrophorèse -----	58
Tableau 7 : Composition des tampons de transfert-----	59
Tableau 8 : Anticorps primaires utilisés en western blot et immunomarquage-----	60
Tableau 9 : Concentration des siRNA utilisés pour la reverse transfection des cellules épithéliales polarisées -----	62
Tableau 10 : Anticorps secondaires utilisés en immunomarquage-----	64
Tableau 11 : Sondes PLA utilisées pour les expériences de duolink-----	65
Tableau 12 : Composition des milieux utilisés pour la chambre de Ussing-----	67
Tableau 13 : Composition des milieux utilisés pour la mesure de Ca^{2+} intracellulaire-----	70
Tableau 14 : Tableau récapitulatif du rôle exercé par les isoformes PLC δ 1, PLC γ 1 et PLC β 3 sur l'influx calcique dans les cellules hAECB non CF et hAECB CF -----	114

Introduction

La mucoviscidose est un problème de famille. Pas seulement parce qu'il s'agit d'une maladie génétique, mais parce qu'elle perturbe tout un ensemble de canaux. En réalité lorsque le canal chlorure CFTR (en anglais « Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator ») est muté dans la mucoviscidose, c'est toute une famille de canaux ioniques qui subit des défauts de fonctionnements. Dès lors, dans cette pathologie, on observe un défaut de sécrétion d'ions chlorure mais aussi une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. Nous avons trouvé pertinent d'étudier les phospholipases C dans le contexte de la mucoviscidose car il s'agit d'enzymes i) qui régulent l'homéostasie calcique cellulaire en contrôlant un nombre important de canaux perméables au Ca^{2+} et ii) qui activent indirectement les protéines kinases C (PKC) tout en favorisant la mobilisation des réserves calciques du réticulum endoplasmique, deux voies de signalisations impliquées dans l'activité de la protéine CFTR.

Ce projet de thèse vise à étudier dans quelle mesure les phospholipases C contrôlent l'homéostasie calcique ainsi que la sécrétion d'ions chlorures dépendante de CFTR dans les cellules épithéliales bronchiques. Dans ce manuscrit nous discuterons des relations qui existent entre les phospholipases C et CFTR dans une cellule épithéliale bronchique normale et dans une cellule épithéliale bronchique qui exprime la mutation CFTR-F508del.

I. L'homéostasie calcique dans la mucoviscidose

La mucoviscidose est caractérisée par des anomalies de l'homéostasie calcique dans les cellules épithéliales des voies aériennes. Cela va avoir des retombées sur l'activité du canal CFTR, sur l'inflammation cellulaire ou encore sur les propriétés du mucus. C'est pourquoi il est important de comprendre les régulations calciques dans une cellule mucoviscidosique par rapport à une cellule qui n'est pas affectée par la maladie, de façon à pouvoir corriger les dysfonctionnements. Dans cette première partie nous définirons la mucoviscidose et nous verrons que l'augmentation calcique dans cette pathologie a des aspects positifs, notamment vis-à-vis de la sécrétion chlorure et la sécrétion de fluides, mais également des effets indésirables, comme par exemple l'augmentation des médiateurs de l'inflammation.

A. La mucoviscidose : maladie génétique aux symptômes pulmonaires dramatiques

La mucoviscidose a été décrite pour la première fois par le Dr Dorothy Andersen en 1938. A cette époque les nouveaux-nés meurent des causes de l'obstruction pancréatique et le Dr Andersen nomme cette pathologie : fibrose kystique du pancréas. La cause de la maladie est encore inconnue mais Andersen

et ses collègues suggèrent qu'il pourrait s'agir d'une maladie héréditaire, la pathologie touchant parfois plusieurs enfants issus d'une même fratrie (ANDERSEN, 1938; Andersen and Hodges, 1946). Il a fallu attendre 1989 pour que le gène responsable de la maladie soit découvert. Ce gène code pour la protéine CFTR et il est localisé sur le chromosome 7 (Riordan et al., 1989). La protéine CFTR est un canal chlorure exprimé au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales de l'organisme. Il existe environ 2000 mutations sur le gène de CFTR responsables de la mucoviscidose (<https://www.cftr2.org>; De Boeck et al., 2014; Sosnay et al., 2013), certaines sont corrélées à une progression très grave de la maladie, c'est le cas des mutations faux-sens comme la mutation CFTR-F508del qui concerne plus de 80 % des patients (Bellis et al., 2017; Rafeeq and Murad, 2017). D'autres mutations sont associées à une progression moins sévère de la maladie, c'est le cas par exemple de la mutation W361R.

1. Des mutations de la protéine CFTR aux manifestations cliniques de la pathologie

Les mutations

Ainsi la plupart des mutations sur le gène qui code pour la protéine CFTR entraînent des défauts de la sécrétion chlorure dont la sévérité est variable. Les mutations sont divisées en six classes en fonction de l'impact de la mutation génétique sur l'expression et la fonction de la protéine (Figure 1).

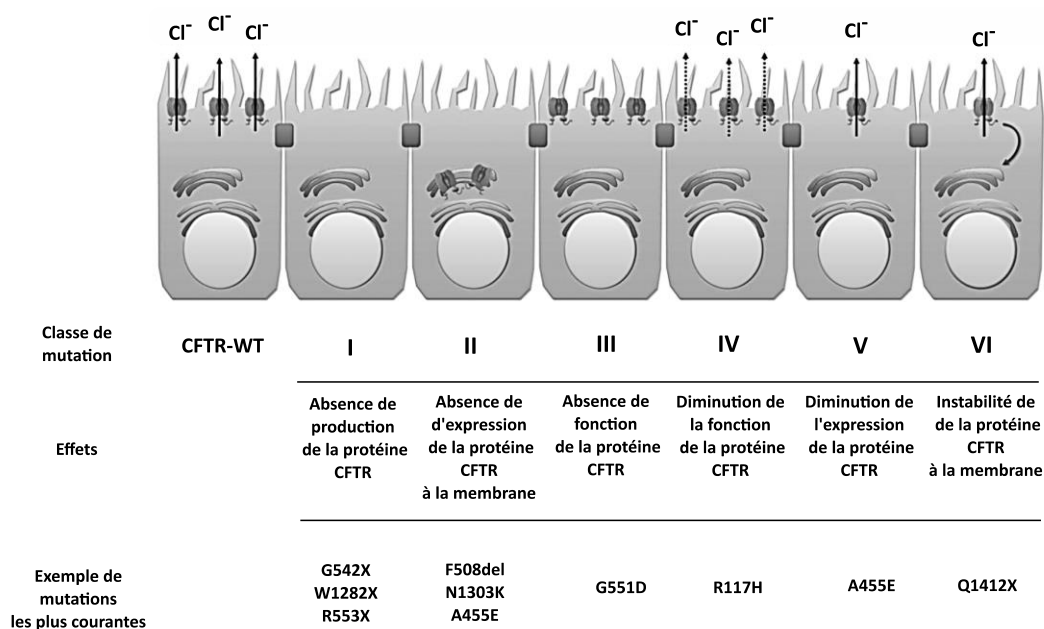


Figure 1 : Effet des différentes classes de mutation du gène codant pour le canal CFTR sur l'expression/fonction de la protéine

Les mutations de classe I, II et III sont associées à une absence de fonction de la protéine CFTR à la membrane plasmique et correspondent à un phénotype sévère. Les mutations de classe IV, V et VI sont associées à la présence d'une fonction résiduelle de la protéine CFTR à la membrane plasmique et représentent les mutations les moins graves de la mucoviscidose (D'après Bell SC, De Boeck K, Amaral MD; Rafeeq and Murad, 2017)

Succinctement, la classe I correspond à une absence de production de la protéine CFTR, la classe II à une rétention de la protéine CFTR dans le réticulum endoplasmique puis une dégradation par le contrôle de qualité, la classe III à un défaut de fonction de la protéine CFTR, la classe IV à une diminution de la fonction canal chlorure, la classe V à une diminution de l'expression de la protéine CFTR et la classe VI à un défaut de stabilité du canal CFTR à la membrane. Les mutations de classe II, qui comprennent la mutation CFTR-F508del, sont les plus fréquentes et concernent plus de 80 % des patients (De Boeck et al., 2014; Elborn, 2016). Dans le cas de la mutation CFTR-F508del, la protéine est mal repliée, séquestrée dans le réticulum endoplasmique, ne sera pas adressée à la membrane mais sera dégradée par la voie du protéasome. La protéine CFTR-F508del peut être partiellement corrigée à la membrane plasmique par un abaissement de la température à 27°C. Une fois à la membrane cette protéine CFTR-F508del possède cependant une diminution de fonction ainsi qu'une réduction de sa stabilité à la membrane. Il est ainsi proposé que le système de classification soit revisité car une mutation peut finalement appartenir à plusieurs classes à la fois (Froux et al., 2018).

Les voies respiratoires, le pancréas, le foie, les intestins, la peau et le système reproducteur sont les principaux organes touchés par la mucoviscidose et en fonction de l'âge des patients, les symptômes de la maladie vont varier. Ainsi jusqu'à l'âge de 10 ans, les manifestations les plus problématiques sont les atteintes pancréatiques et digestives qui entraînent des troubles de la croissance. Ces enfants ont aussi des infections pulmonaires récurrentes à *S. aureus* et *H. influenzae* qui sont prises en charge avec des antibiotiques (Bellis et al., 2017; Rowbotham et al., 2019). Puis à l'adolescence peuvent apparaître une cirrhose et les troubles pulmonaires deviennent plus préoccupants avec l'installation d'une infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* sous forme de biofilms qu'il devient plus difficile de traiter (Lee and Yoon, 2017; Mulcahy et al., 2014). Par la suite les infections pulmonaires à répétition deviennent très graves et peuvent nécessiter la greffe de poumons qui reste le seul moyen de supprimer les troubles pulmonaires dans la mucoviscidose (Elborn, 2016).

L'état le plus préoccupant de la maladie concerne donc les pathologies pulmonaires qui sont responsables du décès de 90 % des patients (Davies, 2002). En effet, dans la maladie, nous observons un défaut de sécrétion d'ions chlorure ainsi qu'une augmentation de l'absorption de Na⁺ par le canal ENaC, ce qui entraîne la production d'un mucus visqueux associée à une déshydratation de la surface des voies respiratoires (Boucher, 2002; Donaldson and Boucher, 2007; Elborn, 2016).

Les traitements

L'espérance de vie des nouveau-nés atteints de la mucoviscidose était de quelques mois seulement dans les années 1940 (Davis, 2006). Depuis les années 2000, l'espérance de vie est d'environ 40 ans dans les pays développés et aujourd'hui, grâce au développement des médicaments, de la

kinésithérapie respiratoire et de la greffe de poumons, on compte plus d'adultes que d'enfants atteints de la maladie (Bellis et al., 2017). Il existe deux catégories de médicaments pour traiter la pathologie, i) les traitements qui visent à combattre les symptômes et les infections bactériennes et comprennent les solutés salins hypertoniques, les corticoïdes, les antibiotiques et ii) les traitements qui ciblent la protéine CFTR et qui varient en fonction de la mutation considérée (Rafeeq and Murad, 2017). Cette dernière catégorie de traitement inclut l'ivacaftor (VX 770, Kalydeco®), un potentiateur qui augmente la probabilité d'ouverture du canal CFTR lorsqu'il est exprimé à la membrane, et le lumacaftor (VX 809), un correcteur qui permet de ramener une partie de la protéine CFTR retenue dans le réticulum endoplasmique à la membrane plasmique (Van Goor et al., 2009, 2011). Ainsi le VX 770 est préconisé pour le traitement des mutations de classe III, IV et V tandis que l'association du VX 770 et du VX 809, dans la spécialité Orkambi®, est préconisée pour les mutations de classe II et notamment la mutation CFTR-F508del. L'association des deux molécules, un correcteur et un potentiateur, donne de bons résultats in vitro mais les réponses aux traitements chez les patients sont variables (Masson et al., 2019). Un autre correcteur a récemment été développé et testé en essais cliniques : le tezacaftor (VX 661). Ce dernier, en combinaison avec l'ivacaftor, augmente la fonction respiratoire et réduit l'exacerbation pulmonaire chez les patients porteurs de la mutation CFTR-F508del (Rowe et al., 2017; Taylor-Cousar et al., 2017).

2. Régulations de la protéine CFTR

Les régulateurs endogènes du canal CFTR

La protéine CFTR appartient à la famille des transporteurs ABC (en anglais « ATP binding cassette ») qui permettent le transport d'un certain nombre de substrats aussi variés que la bile ou les médicaments, via l'hydrolyse de l'ATP (Locher, 2016). La protéine CFTR se compose de deux domaines transmembranaires de six segments chacun (TMD1 et TMD2) et de deux domaines de liaisons aux nucléotides situés sur la face cytosolique (NBD1 et NBD2) entre lesquels s'insère le domaine régulateur R (**Figure 2**) (Liu et al., 2017; Riordan et al., 1989).

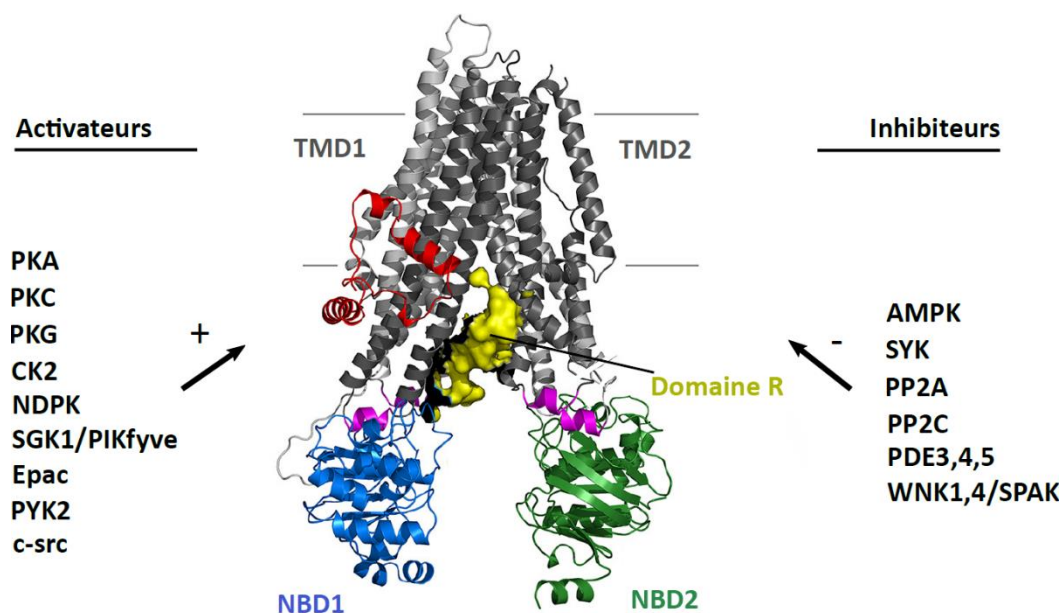


Figure 2 : Structure et principaux régulateurs de la protéine CFTR-WT

La protéine CFTR se compose de deux domaines transmembranaires TMD1 et TMD2, de deux domaines de liaison aux nucléotides situés sur la face cytosolique NBD1 et NBD2 et du domaine régulateur qui est situé entre les domaines NBD1 et NBD2. Parmi les activateurs endogènes de la protéine CFTR nous avons : la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC), la protéine kinase G (PKG), la protéine kinase CK2 (CK2), la nucléoside diphosphate kinase (NDPK), les kinases SGK1/PIKfyve (en anglais serum and glucocorticoid dependent kinase/phosphatidylinositol-3-phosphate-5-kinase), Epac (en anglais exchange protein directly activated by cAMP), et les tyrosine kinases PYK2 et c-src. Parmi les inhibiteurs endogènes de la protéine CFTR nous comptons : la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), la tyrosine kinase SYK, les protéines phosphatases PP2A et PP2B, les phosphodiesterases 3, 4 et 5 (PDE3,4,5) les kinases WNK1,4/SPAK (en anglais with no lysine kinase/SPS-related proline/alanine-rich kinase) (Csanády et al., 2019; Kunzelmann and Mehta, 2013).

Deux mécanismes sont formellement requis pour l'activation de la protéine CFTR : i) la phosphorylation du domaine R par la protéine kinase A (PKA) puis ii) la fixation de l'ATP au niveau des NBDs (Anderson et al., 1991; Liu et al., 2017; Picciotto et al., 1992; Strickland et al., 2019; Tabcharani et al., 1991). Ainsi la PKA, en phosphorylant de nombreuses sérines situées sur le domaine R, est le principal acteur dans l'ouverture du canal CFTR. Cependant, d'autres protéines kinases peuvent moduler l'activité du canal CFTR : c'est le cas de la protéine kinase C (PKC), des tyrosine kinases p60c-Src et Pyk2, et aussi de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) (Kunzelmann and Mehta, 2013). Ainsi, la PKC permet i) d'activer le canal CFTR, même en absence de la PKA, et ii) d'augmenter l'activation du canal CFTR par la PKA (Berger et al., 1993; Chappe et al., 2003). Les tyrosine kinases p60c-Src et Pyk 2 augmentent l'activité de CFTR par le biais de phosphorylations (Billet et al., 2015; Fischer and Machen, 1996). L'AMPK, de son côté, est une protéine kinase qui inhibe CFTR, également par des mécanismes de phosphorylations (Hallows et al., 2000, 2003; Neuman et al., 2018). Enfin les phosphatases 2A (PP2A) et 2C (PP2C) sont deux protéines qui affectent de façon importante le fonctionnement du canal CFTR en diminuant son activité via des mécanismes de déphosphorylation (Luo et al., 1998; Thelin et al., 2005; Travis et al., 1997).

Les régulations de canaux ioniques par CFTR

Le canal CFTR est aussi un régulateur de beaucoup d'autres canaux ioniques, parmi lesquels nous pouvons citer de manière non exhaustive : le canal sodique ENaC (Mall et al., 1996; Rubenstein et al., 2011; Stutts et al., 1995), le canal potassique ROMK (Konstas et al., 2002; Ruknudin et al., 1998) ainsi que les canaux calciques TRPC6 et TRPV4 (Bertrand et al., 2015; Henry et al., 2016). Le canal CFTR régule également des canaux chlorure qu'il serait intéressant d'activer pour compenser le défaut d'activité du canal CFTR muté et restaurer l'hydratation des épithélia (Mall and Galletta, 2015; Martin et al., 2018). Par exemple, le canal ORCC (en anglais « outwardly rectifying chloride channel ») est un canal chlorure qui serait plutôt exprimé au niveau de la membrane basolatérale (Hwang et al., 2000b; Szkotak et al., 2003), qui est activé par la PKA et l'ATP, et dont l'activité dépend de la protéine CFTR (Jovov et al., 1995a, 1995b). Le canal SLC26A9 est un autre canal chlorure qui est exprimé dans les cellules épithéliales, qui est constitutivement actif mais qui peut être stimulé par la forskoline et dont l'activité dépend de la protéine CFTR (Bertrand et al., 2009, 2017; Lohi et al., 2002; Salomon et al., 2016). Enfin, une relation étroite existe entre CFTR et la famille des anoctamines, qui représentent une famille de canaux chlorure activés par le calcium (CaCC). Il a ainsi été montré que l'activité de la protéine CFTR régule négativement les CaCC (Kunzelmann et al., 1997; Ousingsawat et al., 2011; Wei et al., 1999). Il a également été montré que la présence du canal TMEM16A est requise pour l'expression et l'activité du canal CFTR (Benedetto et al., 2017, 2019). Par ailleurs, en présence de la protéine CFTR-F508del, l'expression du canal TMEM16A, qui appartient à cette dernière famille de canaux, est diminuée (Ruffin et al., 2013).

B. Augmentation globale du Ca^{2+} dans la mucoviscidose

1. La régulation des canaux TRP est dysfonctionnelle dans la mucoviscidose

Lors de la découverte de la protéine CFTR, Riordan et ses collègues ont choisi le terme « régulateur », qui constitue la dernière lettre du sigle de la protéine, car ils ont observé que lorsque CFTR est muté, un certain nombre de canaux ioniques présentent également des troubles fonctionnels. De ce fait, la protéine CFTR, au-delà de son rôle de canal ionique, influence les réponses cellulaires.

Ainsi, des études effectuées par notre équipe (Antigny et al., 2011a; Vachel et al., 2015) mais aussi par d'autres laboratoires (Henry et al., 2016; Huguet et al., 2016; Prandini et al., 2016) ont révélé un dysfonctionnement de certains canaux TRP lorsque CFTR n'est plus exprimé à la membrane. Certains canaux possèdent une activité augmentée, c'est par exemple le cas du canal TRPC6, tandis que d'autres ont une activité qui est diminuée, c'est le cas du canal TRPV2 (Antigny et al., 2011a; Lévêque et al., 2018) (**Figure 3**).

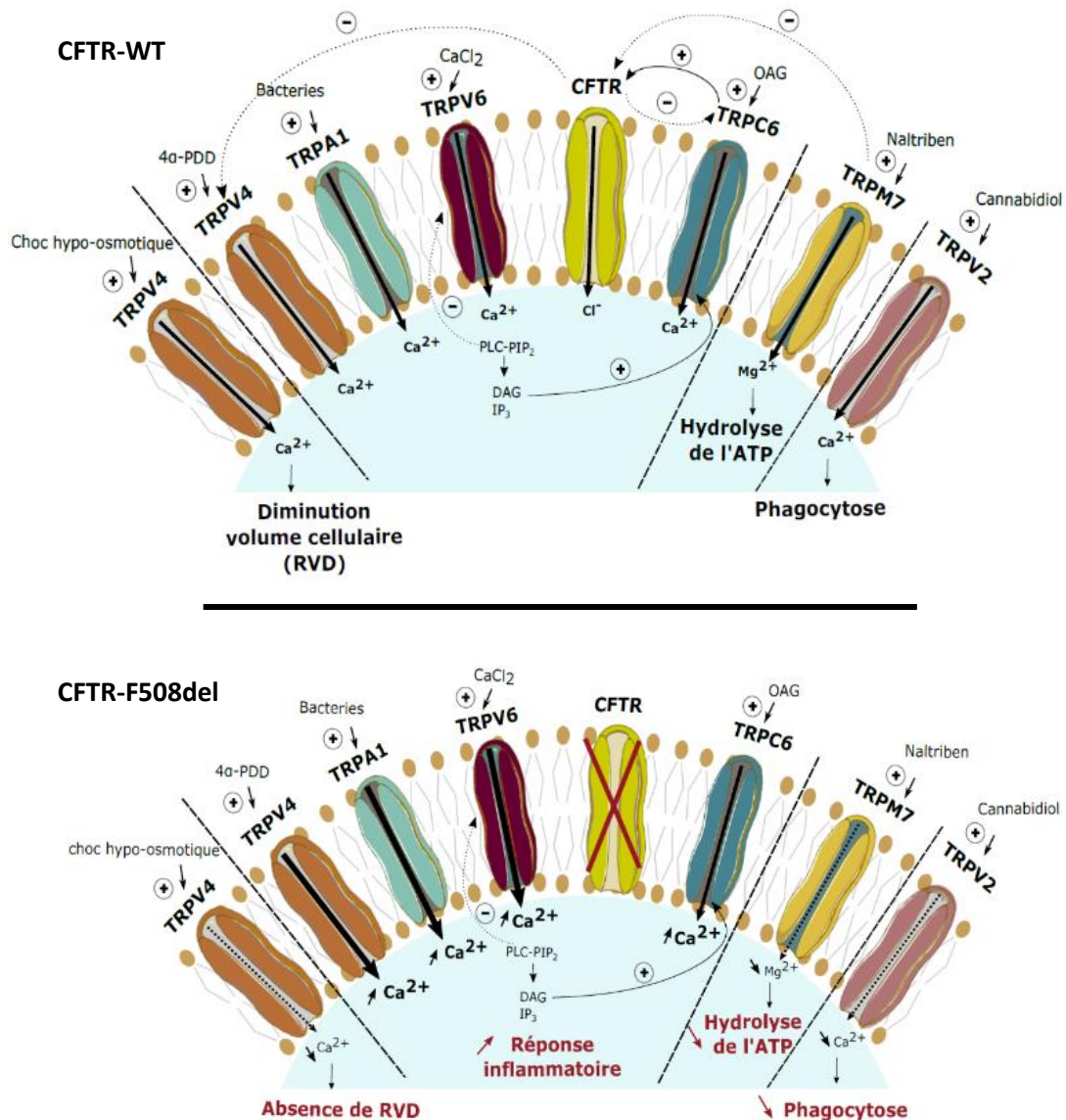


Figure 3 : Aperçu des canaux TRP qui sont dérégulés dans les cellules qui expriment la protéine CFTR-F508del

Le canal CFTR-WT cohabite avec de nombreux canaux ioniques de la famille des TRPs à la surface cellulaire. Nous retrouvons, par exemple, les canaux TRPV4, TRPA1, TRPV6, TRPC6, TRPM7 et TRPV2. Des régulations fonctionnelles ont été établies entre le canal CFTR-WT et certains de ces canaux. Ainsi le canal CFTR-WT régule négativement les canaux TRPV4 et TRPC6, ce dernier régule, à l'inverse, positivement le canal CFTR-WT, et le canal TRPM7, quant à lui, contrôle négativement le canal CFTR-WT. Il apparaît que l'expression du canal CFTR à la membrane est cruciale dans la régulation des canaux TRPs puisque le défaut d'expression de CFTR à la membrane plasmique entraîne des défauts de régulation de ces différents canaux de la famille des TRPs. Ainsi l'entrée calcique par les canaux TRPA1, TRPC6, TRPV4 et TRPV6 est augmentée suite à une stimulation par des bactéries, l'OAG (1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol, analogue du DAG), le 4α-PDD (4α-phorbol-12,13-didecanoate, agoniste de TRPV4) et le CaCl₂ respectivement, dans les cellules qui expriment la protéine CFTR-F508del par rapport aux cellules qui expriment la protéine CFTR-WT. L'augmentation de l'influx calcique par ces canaux entraîne une activation de la réponse inflammatoire. Le canal TRPC6 est aussi activé par le DAG intracellulaire et le canal TRPV6 est un canal constitutivement actif régulé par le Ca²⁺ et la voie PLC-PIP₂. D'un autre côté, l'influx calcique par le canal TRPV4 en réponse à un choc hypo-osmotique dans les cellules épithéliales est diminuée dans les cellules qui expriment la protéine CFTR-F508del, tout comme l'influx calcique par le canal TRPV2 en réponse à son agoniste le cannabidiol dans les macrophages. Ceci a pour conséquence des troubles de la régulation du volume cellulaire et une diminution de la phagocytose. Enfin, la stimulation du canal TRPM7 par son agoniste, le naltriben, provoque une diminution de l'influx de Mg²⁺ dans les cellules qui expriment la protéine CFTR-F508del (Grebert et al., 2019).

En outre il existe des liens fonctionnels et/ou physiques entre le canal CFTR et certains canaux TRP. Le canal CFTR régule par exemple négativement les canaux TRPV4 et TRPC6 (Antigny et al., 2011a; Henry et al., 2016). Réciproquement CFTR est régulé positivement par TRPC6 et négativement par TRPM7 (Antigny et al., 2011a; Huguet et al., 2016). Les différences de régulation des canaux TRP entre des cellules qui expriment la protéine CFTR-WT et celles qui expriment la mutation du CFTR la plus fréquente (CFTR-F508del) ont été regroupées et publiées sous forme de revue par notre équipe en 2019 (Grebert et al., 2019) **cf annexe**. Ainsi, suite à une stimulation par leurs agonistes, l'influx calcique des canaux TRPV4, TRPA1, TRPV6 et TRPC6 est augmenté dans les cellules qui expriment le canal CFTR muté alors que l'activation par un choc hypo-osmotique ou par le cannabidiol, respectivement, diminue l'influx calcique des canaux TRPV4 et TRPV2 lorsque le canal CFTR est muté.

2. Autres anomalies de l'homéostasie calcique dans la mucoviscidose

Les canaux TRP ne sont pas les seuls canaux calciques à subir des défauts de régulation lorsque CFTR est muté. Ainsi, il a été mis en évidence une diminution de l'activité de la Ca^{2+} -ATPase et une augmentation de l'activité des pompes SERCA (en anglais « Sarcoplasmic/Reticulum Ca^{2+} ATPase ») en présence de la mutation CFTR-F508del (Philippe et al., 2015). De plus, il a été observé que la sortie de calcium du réticulum endoplasmique suite à une stimulation par l' IP_3 est supérieure dans les cellules épithéliales qui expriment la mutation CFTR-F508del par rapport aux cellules qui expriment la protéine CFTR-WT (Antigny et al., 2008a). Lorsque la protéine CFTR-F508del est séquestrée dans le réticulum endoplasmique, celui-ci se concentre autour du noyau au lieu de s'étendre dans la totalité du volume cellulaire, comme c'est le cas dans les cellules qui expriment la protéine CFTR-WT (Antigny et al., 2011b). Il est ainsi proposé que dans les cellules qui expriment la protéine mutée, les récepteurs à l' IP_3 , situés dans la membrane du réticulum endoplasmique, se rassemblent sous forme de clusters avec comme conséquence une augmentation de la réponse calcique. La mutation CFTR-F508del affecte également le mécanisme d'influx calcique SOCE (en anglais « Store-operated calcium entry »). L'influx SOCE est médié par l'interaction entre les protéines Orai1 à la membrane plasmique et la protéine STIM1 au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Nguyen et al., 2018; Stathopoulos et al., 2013). En présence de la mutation CFTR-F508del, il se produit une augmentation de l'insertion de la protéine Orai1 à la membrane. Les deux partenaires STIM1 et Orai1 sont alors plus à même d'interagir, favorisant l'entrée de Ca^{2+} intracellulaire (Balghi et al., 2011). Cette équipe a également mis en évidence que ce n'est pas la fonction du canal CFTR, mais sa présence à la membrane plasmique, qui contrôle négativement l'influx SOCE. Enfin, l'influx calcique via l'uniport calcique mitochondrial dans les mitochondries de cellules épithéliales qui expriment la mutation CFTR-F508del est diminué par rapport aux cellules qui expriment la protéine CFTR-WT (Antigny et al., 2009). Ainsi, suite à un

influx de Ca^{2+} ou une sortie de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique, les mitochondries peuvent capter le Ca^{2+} et jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie calcique.

C. Conséquences physiologiques de la dérégulation calcique

1. Régulation de CFTR par le Ca^{2+}

Le canal CFTR est majoritairement activé par l'AMPc, mais plusieurs études suggèrent que le Ca^{2+} participe à l'activation du canal. Il a ainsi été montré que l'activité du canal CFTR est diminuée de moitié en présence du chélateur calcique BAPTA-AM (Billet and Hanrahan, 2013; Hoque et al., 2010; Zhu et al., 2005). De plus, il a été observé qu'une augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire par la thapsigargine, un inhibiteur de la Ca^{2+} -ATPase du réticulum endoplasmique, augmente l'activité du canal CFTR-WT et du canal CFTR-F508del corrigé par le VX 809 (Bozoky et al., 2017). D'ailleurs, même le LPS de *Pseudomonas aeruginosa* stimule le courant CFTR-dépendant dans les cellules épithéliales bronchiques sous la dépendance du Ca^{2+} intracellulaire (Buyck et al., 2013). Ces études mettent en évidence la fonction du Ca^{2+} dans l'activité du canal CFTR. Dans cette partie nous discuterons des différentes voies d'activation, directes ou indirectes, de CFTR par le Ca^{2+} .

La calmoduline

La calmoduline est une protéine de liaison au Ca^{2+} qui régule plusieurs protéines telles que des enzymes ou des canaux ioniques (Chin and Means, 2000; Villalobo et al., 2018). Après avoir fixé quatre ions Ca^{2+} , la calmoduline établit des liaisons avec des partenaires et participe, de ce fait, à leur régulation. Ainsi la calmoduline, une fois activée par le Ca^{2+} , se fixe sur les adénylates cyclases (Halls and Cooper, 2011), le canal Orai 1 (Maganti et al., 2018) ou encore le canal potassique voltage dépendant Kv7.1 (Sachyani et al., 2014) et intervient dans leur régulation.

Il a été mis en évidence que la calmoduline régulait aussi CFTR par interaction directe au niveau de son domaine R, sous la dépendance du Ca^{2+} (Bozoky et al., 2017). Par des expériences de résonance magnétique nucléaire réalisées sur la protéine CFTR purifiée, trois sites de fixation pour la calmoduline ont pu être identifiés, entre les résidus 659-671, 700-715 et 760-780 situés sur le domaine R. Ces observations ont été corrélées à des mesures de l'activité du canal CFTR-WT ou muté pour certaines régions situées sur le domaine R de la protéine et impliquées dans la fixation de la calmoduline (S768A et Δ 760-780). L'activité de ces mutants, suite à une stimulation par la thapsigargine (augmentation du calcium cellulaire) ou la forskoline (augmentation de l'AMPc), est diminuée par rapport à l'activité du canal CFTR non muté, montrant l'importance de la fixation de la calmoduline sur le domaine R dans l'activité du canal CFTR.

Les adénylates cyclases

Peu après la découverte de la protéine CFTR, deux voies distinctes ont été attribuées à l'activation du canal : la voie dépendante du Ca^{2+} et la voie dépendante de l'AMPc. Cependant il a été montré que certaines adénylates cyclases, qui entraînent une augmentation de l'AMPc intracellulaire, peuvent être activées par le Ca^{2+} . Chez l'homme nous dénombrons neuf adénylates cyclases membranaires (AC 1-9) et chacune peut être directement ou indirectement activée par le Ca^{2+} (Halls and Cooper, 2011). Ainsi, les adénylates cyclases 1 et 8 sont directement activées par le Ca^{2+} par une voie dépendante de la calmoduline à des concentrations inférieures au micro molaire (Cali et al., 1994; Tang et al., 1991; Wu et al., 1993). Ces deux adénylates cyclases possèdent des sites de fixation pour la calmoduline (Gu and Cooper, 1999; Vorherr et al., 1993; Wu et al., 1993) et sont stimulées par le couple Ca^{2+} /calmoduline, respectivement avec un K_d de 0,1 μM et 0,5 μM . L'adénylate cyclase 9 est quant à elle activée par le Ca^{2+} de manière indirecte, via les protéines kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendantes (CaM Kinases) II (Cumbay and Watts, 2005). Si les adénylates cyclases peuvent être activées par le Ca^{2+} , elles peuvent également être inhibées par les kinases et phosphatases sous la dépendance du Ca^{2+} . L'adénylate cyclase 9, par exemple, peut être inhibée par la protéine phosphatase dépendante du Ca^{2+} calcineurine (CaN) (Antoni et al., 1998; Martin et al., 2007). D'autre part, les adénylates cyclases 1 et 3 peuvent être inhibées respectivement par les CaM kinases IV et II (Wayman et al., 1996; Wei et al., 1996, 1998). En résumé, les adénylates cyclases 1, 8, et 9 sont activées de manière dépendante du Ca^{2+} et les adénylates cyclases 1, 3 et 9 sont également inhibées de manière dépendante du Ca^{2+} . En outre, Namkung et al., ont montré que l'activation de l'adénylate cyclase 1 par le Ca^{2+} entraîne une activation de la protéine CFTR via la génération d'AMPc (Namkung et al., 2010). Dès lors, d'autres adénylates cyclases pourraient participer à l'activation du canal CFTR. Par exemple l'ARNm des AC 1 et AC 3 a été mis en évidence dans la lignée épithéliale bronchique CFBE (Lérias et al., 2018) et par ailleurs l'ARNm des AC 1, AC 3 et AC 9 a été identifié dans des cellules épithéliales bronchiques primaires (Namkung et al., 2010). Nous avons également regardé l'expression des adénylates cyclases 1, 3, 8 et 9 dans les principaux tissus qui expriment également la protéine CFTR dans la base de données « Human Protein Atlas » <https://www.proteinatlas.org/> pour observer dans quelle mesure leur activation pouvait jouer un rôle dans l'activation du canal CFTR (**Figure 4**).

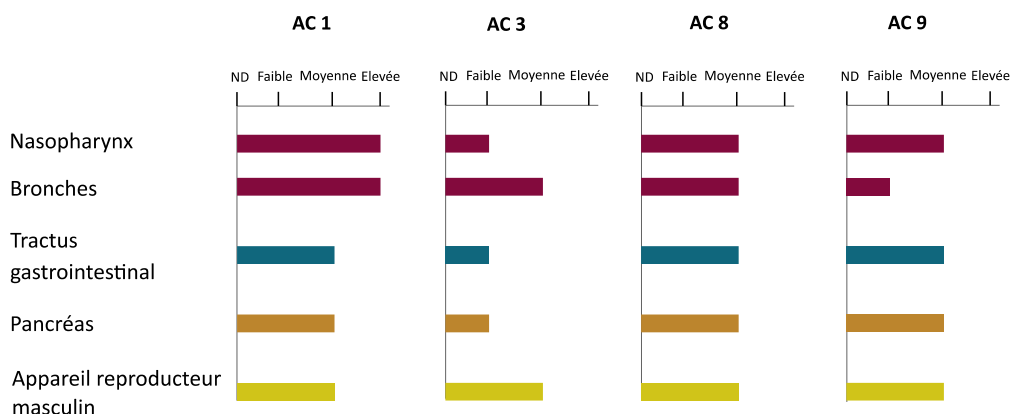


Figure 4 : Expression tissulaire des adénylate cyclases 1, 3, 8 et 9 analysée par le projet « The Human Protein Atlas » dans les principaux tissus qui expriment le canal CFTR

L'expression des quatre protéines a été étudiée par immunohistochimie dans différents tissus provenant de 144 individus que constitue la base de donnée Suédoise « The human protein Atlas » : <https://www.proteinatlas.org/>. L'expression de chaque protéine s'échelonne de non détectée (ND) à élevée au sein des échantillons. AC : adénylate cyclase. Les données concernant l'AC 1 sont préliminaires car observées avec des anticorps en cours de validation, les données concernant l'AC 3, l'AC 8 et l'AC 9 sont considérées comme fiables car observées avec des anticorps validés.

Cette base de données a étudié par immunohistochimie l'expression des différentes isoformes d'adénylates cyclases dans 44 tissus. L'expression des adénylates cyclases 1, 3, 8 et 9 est établi dans le nasopharynx, les bronches, le pancréas et le système de reproduction masculin mais l'adénylate cyclase 3 est globalement plus faiblement exprimée que les autres. En tenant compte du fait que les AC 1, AC 3, AC 8 et AC 9 sont régulées par le Ca^{2+} , il est à supposer que ces isoformes jouent un rôle dans l'activation du canal CFTR par le Ca^{2+} dans les cellules épithéliales du nasopharynx, des bronches, du tractus gastro-intestinal, du pancréas et de l'appareil reproducteur masculin.

Les tyrosines kinases

Une régulation du canal CFTR par des tyrosine kinases dépendantes du Ca^{2+} a aussi été mise en évidence. En effet, Billet et ses collègues ont étudié la voie d'activation du canal CFTR qui passe par les récepteurs couplés aux protéines G et ont montré que la stimulation par l'agoniste cholinergique carbachol est deux fois plus faible en présence du chélateur calcique perméable BAPTA-AM (Billet et al., 2013). Ils ont montré que l'activation du CFTR par le carbachol passe par deux voies de signalisation distinctes : la première met en jeu la PKA et la seconde des tyrosine kinases. La première voie d'activation n'est pas dépendante du Ca^{2+} mais la seconde voie est dépendante du Ca^{2+} . Ainsi, deux tyrosine kinases ont été imputées dans l'activité du CFTR : les tyrosine kinases Src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase) et la tyrosine kinase Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2). Celles-ci, toutes deux activées par les RCPG (récepteurs couplés aux protéines G) (Litvak et al., 2000; Luttrell and Luttrell,

2004; Watcharasit et al., 2001), se rassemblent sous forme de complexe pour s'activer réciproquement sous la dépendance du Ca^{2+} (Anguita and Villalobo, 2018; Wu et al., 2006). Le rôle de ces tyrosine kinases dans l'activation de CFTR est renforcé par le fait que l'inhibition de la protéine Src, tout comme l'inhibition de la protéine Pyk, aboutit à la diminution de l'activation du canal CFTR par le carbachol (Billet et al., 2013). En résumé les tyrosine kinases Pyk2 et Src, dont l'activité est régulée par le Ca^{2+} intracellulaire, agissent de concert pour phosphoryler la protéine CFTR au cours d'une stimulation par le carbachol.

Les annexines

Depuis leur découverte dans les années 1980, les annexines ont fait l'objet d'intenses recherches, car impliquées dans pléthore de mécanismes fondamentaux cellulaires. Ce sont des protéines de liaison au Ca^{2+} et aux phospholipides et il en existe douze chez l'homme (Annexine 1-11 et Annexine 13) (Gerke and Moss, 2002). Elles contrôlent, via leur fixation aux phospholipides membranaires, l'endocytose (König and Gerke, 2000; Rentero et al., 2018; Seemann et al., 1997), l'exocytose (Bandorowicz-Pikuła and Seliga, 2018; Burgoyne, 1988; Gabel et al., 2015), et les interactions entre cellules (Hu et al., 2008; López-Rodríguez et al., 2018). Ces protéines interviennent également dans la fonctionnalité de canaux ioniques (Fleet et al., 1999; van de Graaf et al., 2003; Naciff et al., 1996) et peuvent même, en s'insérant dans la membrane, faire fonction de canaux ioniques (Arispe et al., 1996; Golczak et al., 2001; Isas et al., 2000). Aux vues de leur capacité à réguler les protéines membranaires, quelques équipes ont étudié leur impact sur le transport et la fonctionnalité du canal CFTR.

Une équipe de chercheurs Français a découvert en 1991 de fortes homologues de séquences entre huit des douze annexines exprimées chez l'homme et la protéine CFTR entre les résidus 500 et 529 (Chap et al., 1991). Cette découverte laisse supposer l'existence de connexions entre les annexines et CFTR et en 2007, deux équipes ont impliquées les annexines dans l'activité du canal CFTR.

En effet, il a été mis en évidence que l'annexine 2, en association avec la protéine de liaison au Ca^{2+} S100A10, active le canal CFTR par une voie dépendante du Ca^{2+} et de la PKA (Borthwick et al., 2007, 2008a). L'équipe a identifié la formation d'un complexe membranaire impliquant les protéines annexine 2, S100A10 et CFTR suite à une stimulation forskoline + IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine, un inhibiteur de phosphodiésterases) dans les cellules épithéliales bronchiques 16HBE14o- qui expriment le canal CFTR-WT de manière endogène. Le complexe formé par les deux protéines annexine 2 et S100A10 a été largement étudié et la séquence en acides aminés de la portion de la protéine annexine 2 qui permet sa fixation à la protéine S100A10 a été déterminée (Liu et al., 2015a; Réty et al., 1999). Dès lors, la rupture du complexe formé par ces deux protéines a pu être envisagée pour réaliser des expériences de fonctionnalité de la protéine CFTR en présence ou en absence du complexe annexine 2-S100A10. Ainsi Borthwick *et al.*, ont observé par des expériences de patch-clamp dans des

cellules 16HBE14o-, que l'ajout du peptide bloquant Ac1-14, qui empêche la fixation de l'annexine 2 à son partenaire S100A10, diminue l'activité du canal CFTR (Borthwick et al., 2007). Par conséquent, c'est bien le complexe formé par les protéines annexine 2 et S100A10 qui intervient dans l'activité du canal CFTR. L'équipe a mis en évidence que la formation de ce complexe est sous la dépendance de la calcineurine (protéine phosphatase dépendante du Ca^{2+}) et de la PKA (Muimo, 2009). Par ailleurs, dans les cellules CFBE41o-, qui expriment la mutation CFTR-F508del de façon endogène, un défaut de formation du complexe annexine 2-S100A10-CFTR a été observé (Borthwick et al., 2008a). Par conséquent, la protéine CFTR-F508del n'est pas activée de la même façon que la protéine CFTR-WT par le complexe annexine 2-S100A10.

Une autre annexine, l'annexine 5, a aussi été étudiée dans le cadre de la régulation du canal CFTR. Cette protéine se lie aux phospholipides membranaires d'une manière dépendante du Ca^{2+} (Brisson et al., 1991; Swairjo et al., 1995). Par des expériences d'interférence par ARN, Trouvé *et al.*, ont montré que la diminution de l'expression de l'annexine 5 dans des cellules épithéliales entraîne une diminution de l'expression de la protéine CFTR à la membrane et une diminution de l'activité du canal (Trouvé et al., 2007). A l'inverse, la surexpression de l'annexine 5 est corrélée à une augmentation de l'expression membranaire du canal CFTR ainsi qu'à une augmentation de son activité. En outre, l'annexine 5 favorise l'acheminement à la membrane et donc la fonction du canal CFTR-WT. L'équipe a par ailleurs montré que l'annexine 5 se fixe au domaine NBD1 du CFTR-WT, mais aussi du CFTR-F508del, sous la dépendance du Ca^{2+} et de l'ATP. Il s'est donc révélé possible que l'annexine 5 joue un rôle dans l'activité du CFTR-F508del. La mesure de l'activité du CFTR a été réalisée dans des cellules épithéliales pulmonaires A549 transfectées avec la protéine CFTR-F508del et il a été observé que lorsque l'expression de l'annexine 5 est diminuée, l'activité du CFTR-F508del est significativement diminuée, et que la réciproque est également valable : lorsque l'expression de l'annexine 5 est augmentée, l'activité de la protéine CFTR-F508del est aussi augmentée de manière significative (Le Drévo et al., 2008). Cette découverte a été associée à une expérience de biotinylation de surface qui a révélé que la sur-expression de l'annexine 5 entraîne une augmentation de l'expression membranaire de la protéine CFTR-F508del. De manière très intéressante, le traitement par la thapsigargine, qui augmente le Ca^{2+} intracellulaire, dans des cellules qui sur-expriment l'annexine 5, augmente davantage encore l'activité et l'expression membranaire du canal CFTR-F508del (Le Drévo et al., 2008).

L'ensemble de ces études révèle le rôle majeur du Ca^{2+} intracellulaire, dans la régulation de l'activité des annexines, mais aussi dans la régulation de la calmoduline, des adénylates cyclases activées par le Ca^{2+} , et des tyrosines kinases Pyk2 et Src, et qui se répercute sur l'activité et/ou l'expression membranaire de la protéine CFTR (**Figure 5**).

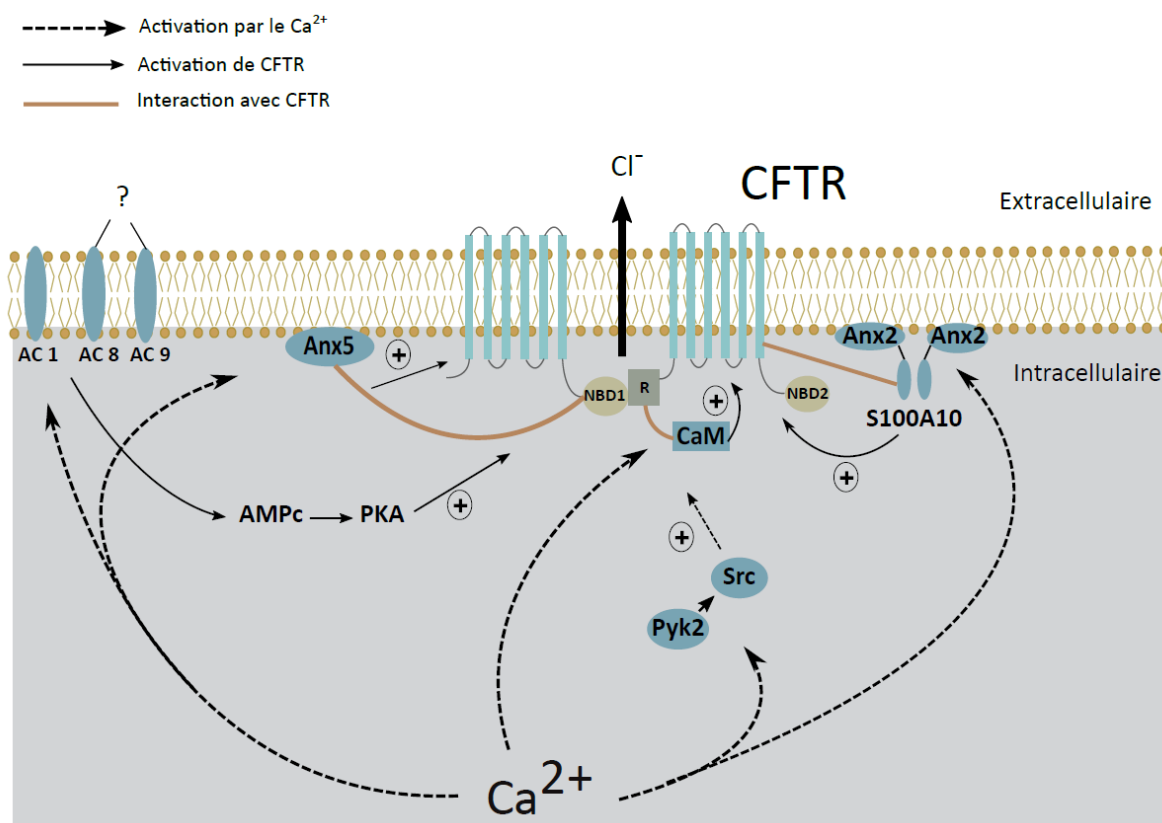


Figure 5 : Rôle du Ca^{2+} dans l'activation du canal CFTR

Le Ca^{2+} active la calmoduline, qui interagit avec le domaine R pour activer CFTR. Le calcium active aussi l'AC 1 (adénylate cyclase) (et potentiellement les AC 8 et AC 9), et active le canal CFTR en augmentant l'AMPc intracellulaire. Le Ca^{2+} régule aussi les tyrosine kinases pyk2 et Src qui activent toutes les deux CFTR. Enfin le Ca^{2+} favorise la liaison aux phospholipides membranaires des annexines 2 et 5 et permet la formation de complexes entre les trois protéines annexine 2-S100A10-CFTR et entre l'annexine 5 et le domaine NBD1 de CFTR.

Même si le Ca^{2+} joue globalement en faveur d'une activation de la protéine CFTR, d'autres études montrent qu'une fois le canal CFTR activé, l'induction d'une augmentation calcique intracellulaire entraîne l'internalisation du canal. En effet, le traitement par la thapsigargine ou l'ATP, qui provoque une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, induit une chute du courant CFTR-WT précédemment activé par la forskoline (Bozoky et al., 2017; Patel et al., 2018). Pour autant, l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire n'entraîne pas de changement dans la probabilité d'ouverture du canal CFTR-WT (Patel et al., 2018). En réalité l'augmentation de Ca^{2+} cytosolique, lorsqu'elle suit une activation par la forskoline, favorise l'internalisation de la protéine CFTR via l'activation du complexe calcineurine-dynamine, avec comme conséquence une diminution de son expression membranaire (Patel et al., 2018; Rasmussen et al., 2014).

2. Inflammation et infection pulmonaire

La viscosité du mucus issu de patients atteints de mucoviscidose ainsi que celle du mucus issu de modèles animaux pour la mucoviscidose est augmentée (Henderson et al., 2014; Jayaraman et al., 2001; Tang et al., 2016; Thiagarajah et al., 2004). Il existe majoritairement deux paramètres qui augmentent la viscosité du mucus : la diminution du pH intracellulaire et l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. Ainsi il a été montré que le Ca^{2+} , à pH physiologique, augmente la viscosité du mucus (Raynal et al., 2003; Tang et al., 2016). En effet, le calcium se fixe au niveau de sites de fixation au Ca^{2+} sur la mucine pour modifier ses propriétés (Forstner and Forstner, 1975; Ridley et al., 2014). Il a notamment été montré que la mucine MUC5B, via l'établissement de liaisons avec le calcium, favorise l'assemblage des mucines entre elles (**Figure 6**).

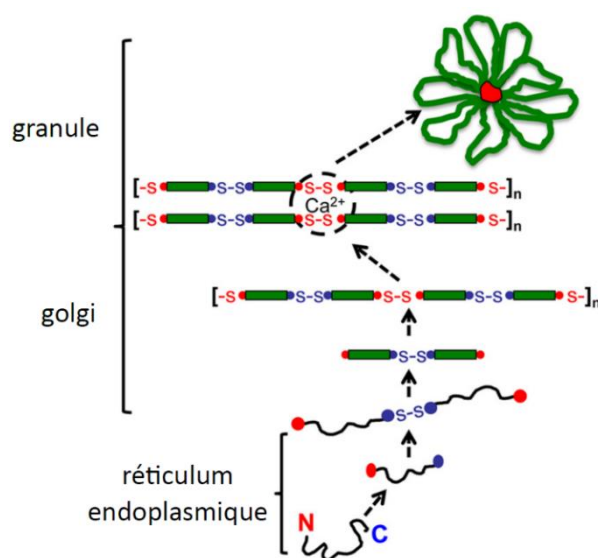


Figure 6 : L'assemblage intracellulaire de la mucine MUC5B

Le polypeptide MUC5B se dimérise via ses extrémités C-terminales (en bleu) dans le réticulum endoplasmique. Une fois dans l'appareil de Golgi, les dimères de MUC5B sont glycosylés puis assemblés en polymères linéaires au niveau de leurs extrémités N-terminales (en rouge). Le long de la voie de sécrétion, le pH diminue et la concentration en Ca^{2+} augmente. Les extrémités N-terminales situées au niveau des dimères de MUC5B établissent alors des liaisons avec le Ca^{2+} , ce qui favorise l'agglomération des mucines dans les granules de sécrétion (Ridley et al., 2014).

La protéine MUC5B est exprimée au niveau des glandes salivaires, des glandes nasales, des glandes sous-muqueuses respiratoires et au niveau de la vésicule biliaire (Kreda et al., 2012), or ces différents organes sont touchés par la production de mucus visqueux dans la mucoviscidose. Il a également été montré chez la souris que l'aggrégation d'une autre mucine, la mucine MUC2 exprimée au niveau du colon, est favorisée à pH acide et à forte concentration calcique (Ambort et al., 2012). Ainsi, il apparaît que la diminution de la concentration en Ca^{2+} , au niveau des organes qui expriment différentes

mucines, pourrait s'avérer propice pour réduire les obstructions par le mucus dans le contexte de la mucoviscidose. Il a d'ailleurs été montré que la chélation du calcium par l'EDTA permet de réduire l'épaisseur du mucus sécrété par l'épithélium respiratoire dans un modèle murin de mucoviscidose (Gustafsson et al., 2012). Le Ca^{2+} , qui augmente la viscosité du mucus, est donc un élément qui aggrave l'obstruction chez les patients atteints de mucoviscidose.

Il a été montré que le Ca^{2+} était directement corrélé à l'inflammation, puisque l'augmentation calcique prolongée qui suit une stimulation à l'IL-1 β , s'accompagne d'une activation du NF- κ B dans des cellules épithéliales bronchiques qui expriment un CFTR muté (Tabary et al., 2006). Le NF- κ B est un facteur de transcription clé dans l'inflammation, y compris dans les cellules épithéliales bronchiques, car il contrôle l'expression de médiateurs inflammatoires tels que les interleukines 2, 3, 6, 8 et 12 (May and Ghosh, 1998; Ribeiro, 2006). De plus, le fait de chélater le Ca^{2+} permet une diminution de l'activation du NF- κ B dans ces cellules, montrant une réelle implication de cet acteur dans l'inflammation des cellules bronchiques (Tabary et al., 2006). Par ailleurs, il a été montré que le canal TRPV4, qui est un canal sensible au calcium, joue un rôle dans la l'inflammation de l'épithélium pulmonaire de patients atteints de mucoviscidose (Henry et al., 2016). Ce canal est régulé négativement par le canal CFTR, et surtout, active différentes voies de signalisations impliquées dans l'inflammation. De plus, quatre médiateurs lipidiques de la famille des acides epoxyeicosatriénoïques, qui sont également des agonistes du canal TRPV4, sont retrouvés dans les expectorations de patients, suggérant une activation d'autant plus importante de ce canal dans les cellules pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose. L'augmentation calcique intracellulaire est aussi associée à une diminution de l'activité antimicrobienne des cellules immunitaires qui expriment un CFTR muté. Ainsi les neutrophiles issus des patients atteints de la mucoviscidose possèdent des propriétés anti-infectieuses diminuées contre le pathogène *B. cenocepacia*. Ceci serait directement attribuable au fait que la concentration en Ca^{2+} , qui est augmentée dans les neutrophiles de patients, diminue l'activité de la NADPH, et donc de la formation de dérivés actifs de l'oxygène, indispensables pour neutraliser *B. cenocepacia* (Robledo-Avila et al., 2018).

Le Ca^{2+} est donc plutôt considéré comme un médiateur de l'inflammation, mais il peut aussi intervenir favorablement dans la réponse immunitaire. Les macrophages issus de patients atteints de mucoviscidose ont une activité phagocytaire diminuée par rapport aux sujets sains (Lévêque et al., 2017). En effet, il a été montré que la réponse immunitaire efficace contre une infection par *P. aeruginosa* nécessite le recrutement de TRPV2, canal sensible au calcium. Cependant, un défaut de recrutement de ce canal a été mis en évidence dans les macrophages de patients atteints de la mucoviscidose (Lévêque et al., 2018).

3. Le Ca^{2+} favorise la sécrétion de fluides via l'activation des CaCC

La sécrétion d'eau par l'épithélium respiratoire suit un gradient de concentration ionique. En effet, elle est conditionnée par les compositions ioniques extracellulaire et intracellulaire, et donc par l'expression de canaux, pompes et co-transporteurs exprimés au niveau des membranes apicales et basolatérales de l'épithélium respiratoire. Ainsi l'absorption d'eau est généralement influencée par une entrée de Na^+ dans la cellule via le canal ENaC exprimé au niveau apical et via la pompe sodium-potassium ($\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase) exprimée au niveau basolatéral. A l'inverse, la sécrétion d'eau est conditionnée par la sortie d'ions Cl^- vers le milieu extracellulaire par les canaux chlorure, dont le canal CFTR (Saint-Criq and Gray, 2017). Le Ca^{2+} intracellulaire agit sur certains des canaux impliqués dans le transport d'eau pour induire une sécrétion de fluides qui est bénéfique au niveau des cellules épithéliales. En effet, une corrélation directe entre l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire et la sécrétion de fluide a pu être établie au niveau des cellules séreuses de l'épithélium respiratoire (Lee and Foskett, 2014). En effet, il a été montré que dans des cellules séreuses bronchiques porcines ainsi que dans des cellules séreuses nasales de rat, une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire est corrélée à une diminution de la concentration de Cl^- intracellulaire et à une diminution du volume cellulaire, traduisant une sécrétion d'eau (**Figure 7**) (Lee and Foskett, 2010; Lee et al., 2007b). Ainsi, dans ces modèles animaux, le Ca^{2+} intracellulaire favorise une sécrétion d'eau qui est dépendante de la sécrétion d'ions chlorure mais qui ne serait pas directement dépendante de la fonction du canal CFTR. En effet, les cellules séreuses murines qui n'expriment pas CFTR tout comme celles qui expriment CFTR, mais qui sont traitées par son inhibiteur, présentent le même efflux d'eau et d'ions Cl^- que des cellules qui expriment CFTR (Lee et al., 2007b). De même, la sécrétion d'eau induite par le Ca^{2+} dans les cellules séreuses porcines, est inhibée par l'acide niflumique, un inhibiteur des CaCC, mais pas par le GlyH-101, un inhibiteur du canal CFTR (Lee and Foskett, 2010). En résumé, le Ca^{2+} intracellulaire participe à la sortie d'eau de l'épithélium pulmonaire via les CaCC.

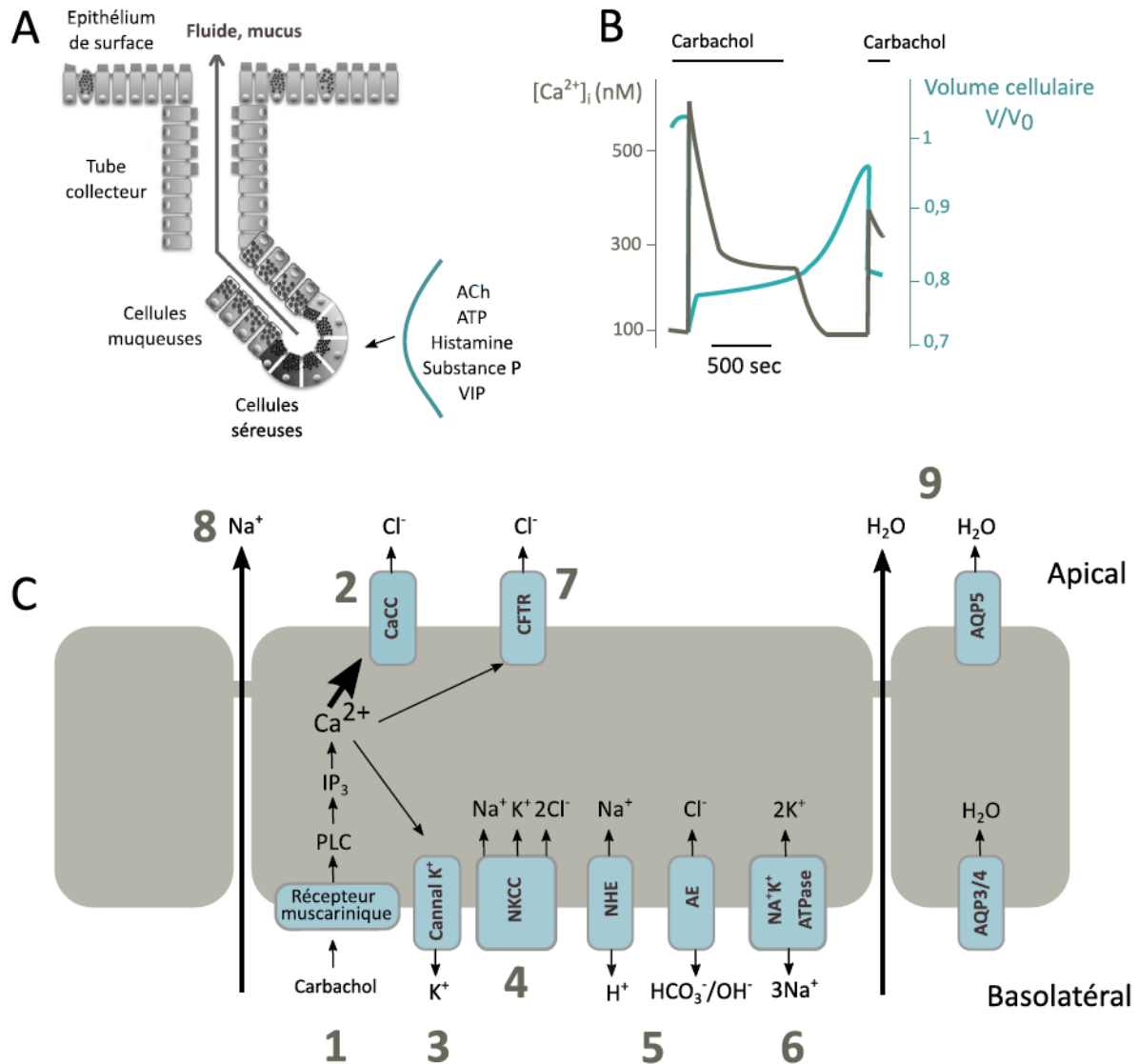


Figure 7 : Activation de la sécrétion d'eau par le Ca^{2+} intracellulaire

A) Représentation de l'épithélium des voies aériennes impliqué dans la sécrétion de fluides : les substances qui induisent une augmentation de Ca^{2+} , comme l'ATP ou l'histamine, entraînent une sécrétion de fluides par les cellules sereuses qui va rejoindre la surface de l'épithélium en même temps que le mucus produit par les cellules muqueuses. **B)** La stimulation par 100 μM de carbachol entraîne une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, corrélée à une diminution du volume cellulaire qui représente une sortie d'eau au niveau des glandes sereuses respiratoires d'un modèle porcin. **C)** Représentation schématique de la voie de signalisation conduisant à une sécrétion d'eau induite par une stimulation carbachol dans des cellules sereuses respiratoires d'un modèle porcin. 1 : Le carbachol entraîne une activation des phospholipases C (PLC) puis une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire via l'IP₃. 2 : Le Ca^{2+} active la sortie d'ions Cl^- via les CaCC. 3 : La sortie d'ion Cl^- entraîne une sortie d'ions K^+ par les canaux potassiques, qui peuvent également être activés par le Ca^{2+} , du côté basolatéral. 4, 5 et 6 : la sécrétion d'ions Cl^- est soutenue par l'activation des NKCC et l'activité conjointe de l'échangeur Na^+/H^+ (NHE) et de l'échangeur anionique (AE) exprimés au niveau basolatéral. La Na^+K^+ ATPase intervient dans la sécrétion d'ions Cl^- via la création d'un gradient Na^+ qui vient renforcer l'activité des trois transporteurs NKCC, NHE et AE. 7 : CFTR sécrète des ions Cl^- mais il apparaît qu'il n'intervient pas directement dans la sécrétion d'eau. 8 : suite à la création d'un gradient Cl^- vers le milieu extracellulaire il se forme un transport de Na^+ via la voie para cellulaire. 9 : le gradient de Cl^- et Na^+ vers le milieu extracellulaire conduit à une sortie d'eau qui suit un gradient osmotique, à travers les aquaporines et également via la voie para cellulaire. D'après (Lee and Foskett, 2010, 2014)

II. Les phospholipases C

Les phospholipases C peuvent être activées par le Ca^{2+} mais sont également responsables de l'augmentation calcique intracellulaire. Nous exposerons dans cette partie l'expression tissulaire, les fonctions physiologiques et la régulation des différentes isoformes de PLC dans le but de comprendre leur rôle dans les cellules épithéliales qui expriment également la protéine CFTR.

Les membranes biologiques sont constituées essentiellement de phospholipides enchassés sous forme de bicouche, les têtes polaires vers l'extérieur et les acides gras hydrophobes formant l'intérieur de la bicouche. Le rôle des membranes s'étend au-delà de celui de barrière physique, puisqu'elles permettent aussi de convertir des signaux extracellulaires en réponses intracellulaires par le biais de canaux exprimés à la membrane mais également via l'hydrolyse des phospholipides membranaire par les phospholipases en un certain nombre de messagers intracellulaires, tels que le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP_3) pour citer les plus connus.

Les phospholipases sont des enzymes qui interviennent dans le métabolisme des glycérophospholipides pour former des seconds messagers intracellulaires. Elles sont au nombre de quatre : la phospholipase A1, la phospholipase A2, la phospholipase C et la phospholipase D (**Figure 8**).

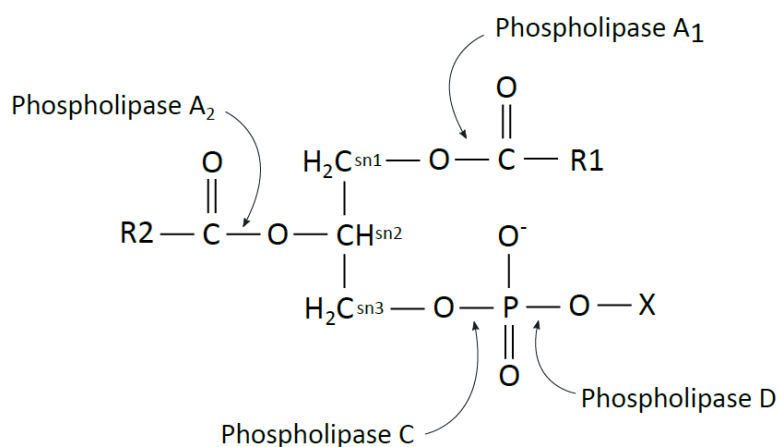


Figure 8 : Sites d'actions des différentes phospholipases sur les glycérophospholipides

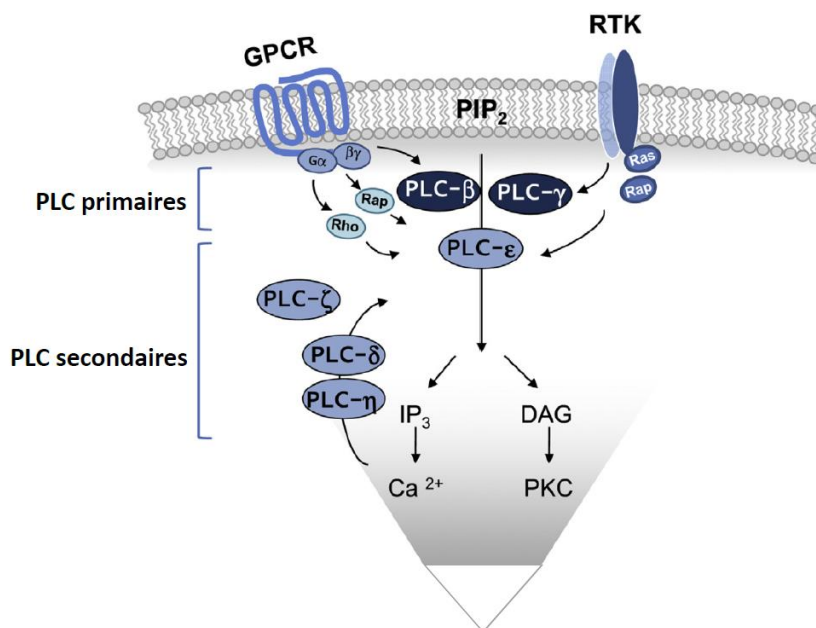
La phospholipase A1 et la phospholipase A2 génèrent chacune un acide gras et un lysophospholipide, la phospholipase C produit un diglycéride et un alcool phosphorylé tandis que la phospholipase D génère un acide phosphatidique et un alcool. R1 et R2 = acides gras et X = choline, éthanamine, sérine, ou inositol biphosphate d'après (Capper and Marshall, 2001).

Les quatre principaux phospholipides retrouvés au niveau des membranes sont la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine et la sphingomyéline. Deux autres lipides sont retrouvés en quantité plus faible : l'acide phosphatidique et le phosphatidylinositol (Suetsugu et al., 2014). Ce dernier, le moins abondant des lipides membranaires, est néanmoins considéré comme un

phospholipide fondamental pour la régulation des fonctions cellulaires. Localisé au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique, il est globalement inerte, mais sous l'action de kinases, il va subir des transformations pour générer des produits phosphorylés : les phosphoinositides. Parmi les plus importants des sept phosphoinositides qui existent, nous comptons le phosphatidylinositol-4-phosphate (PIP), le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) et le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃) (Di Paolo and De Camilli, 2006).

L'histoire des phospholipases C (PLC) commence avec l'étude du métabolisme des phosphoinositides dans les années 1980. Il a d'abord été observé que le métabolisme des phosphoinositides membranaires était corrélé à des variations de Ca²⁺ intracellulaire (Fain and Berridge, 1979; Michell, 1975). En parallèle la protéine kinase C (PKC) (Takai et al., 1977) et son activateur endogène, le diacylglycerol (DAG), furent découverts (Takai et al., 1979). Toujours au début des années 1980, les chercheurs réussirent à purifier les premières PLC (Hofmann and Majerus, 1982; Takenawa and Nagai, 1981). Par la suite, Streb et ses collaborateurs ont identifié l'IP₃ comme second messenger responsable de la libération des stocks calciques du réticulum endoplasmique (Streb et al., 1983). L'histoire s'est compliquée lorsqu'à la fin des années 1980 il est apparu qu'il existait plusieurs isoformes de phospholipases C. Rhee et ses collaborateurs ont d'abord découvert 3 phospholipases C de tailles différentes qu'ils ont nommé PLC-I, PLC-II et PLC-III (Ryu et al., 1986, 1987), puis de nouvelles PLC ont été découvertes dans plusieurs espèces de mammifères en l'espace de deux ans par différentes équipes. Il a alors été convenu de nommer les phospholipases C déjà identifiées avec des lettres grecques : PLC α , PLC β , PLC γ et PLC δ (Rhee, 2013). Au début des années 2000, trois nouvelles phospholipases C ont été découvertes : PLC ϵ , PLC ζ et PLC η (Rhee, 2013). Pour l'anecdote, la nomenclature des isoformes de PLC commence désormais à partir de la lettre β car il s'est trouvé que l'isoforme α qui avait été isolé ne possédait finalement pas les propriétés des PLC.

Toutes les phospholipases C ont la même fonction, c'est-à-dire cliver le PIP₂ membranaire en IP₃ et en DAG (Nakamura and Fukami, 2017). En revanche les PLC ne sont pas toutes activées de la même manière : selon l'isoforme, elles vont être activées soit par des récepteurs couplés aux protéines G, soit par des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) ou encore par le Ca²⁺ intracellulaire (**Figure 9**).



Diverses régulations cellulaires

Figure 9 : Schéma simplifié représentant la signalisation cellulaire impliquant les phospholipases C

Les PLC β sont activées par les sous-unités G α et G $\beta\gamma$ des RCPG, les PLC γ sont activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase, les PLC ϵ sont activées par les petites GTPases (RAP2B et RHOA), les PLC δ et PLC η sont activées par le Ca²⁺ intracellulaire tandis que les PLC ζ seraient constitutivement actives. Une fois activées les PLC hydrolysent le PIP₂ pour générer deux seconds messagers : l'IP₃ et le DAG. L'IP₃ entraîne la libération des stocks calciques du réticulum endoplasmique et le DAG active la PKC (d'après Yang et al., 2013).

Dans cette partie seront abordées les différentes isoformes de PLC exprimées chez l'homme, leur expression tissulaire et leurs fonctions physiologiques, puis leur régulation. Enfin nous parlerons de la pertinence de l'étude des phospholipases C dans les voies respiratoires.

A. Structure

Les PLC sont divisées en six classes qui diffèrent selon leur structure et leur mode d'activation. Ces six classes comprennent les PLC β , PLC γ , PLC δ , PLC ϵ , PLC ζ et PLC η . Les PLC sont chacune composées d'une partie commune entre chaque isoforme : le domaine PH (Pleckstrin Homology) (à l'exception de la PLC ζ qui ne contient pas ce domaine), quatre motifs EF hands, une région X, une région Y et un domaine C2 (**Figure 10**).

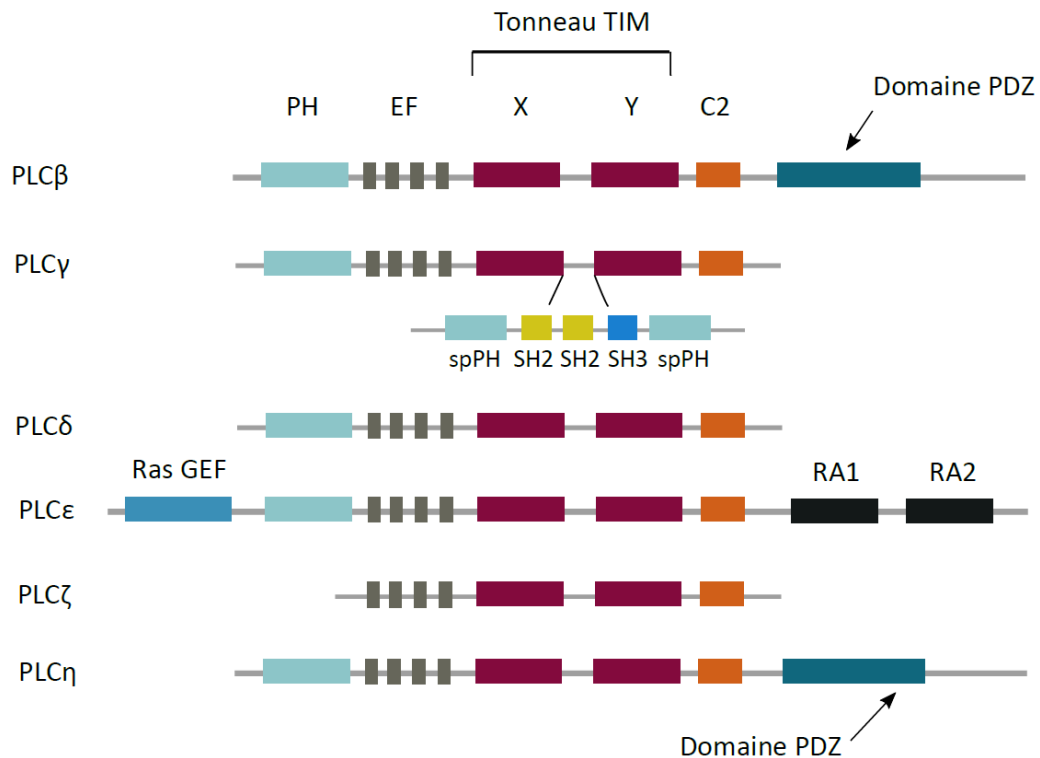


Figure 10 : Domaines structuraux des six familles de PLC qui sont retrouvées chez les mammifères
 PH, domaine « pleckstrin homology » ; EF, domaines « EF hands » ; X et Y, domaine catalytique ; C2, domaine C2, SH2 et SH3, domaine « Src homology 2/3 » ; RA, domaine « RAS-binding » ; Ras GEF, domaine « guanine-nucleotide exchange factor » (d'après Vines, 2012).

Le domaine PH se lie à des partenaires cellulaires, comme le PIP_2 , le PIP_3 , et les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G ou les GTPases Rac (Falasca et al., 1998; Paterson et al., 1995; Wang et al., 2000). La fonction des domaines EF hands n'est pas totalement comprise. Dans le cas de la $\text{PLC}\delta 1$, ces domaines pourraient se lier au Ca^{2+} et ainsi favoriser l'interaction du domaine PH avec le PIP_2 et dans le cas de la $\text{PLC}\beta 3$ les domaines EF hands servent de liaison aux protéines $\text{G}\alpha_q$ (Waldo et al., 2010; Yamamoto et al., 1999). Le tonneau TIM (Triose-phosphate isomérase) se compose des régions X et Y correspondant à une alternance d'hélices α et de feuillets β (Essen et al., 1996). Le tonneau TIM, qui constitue le domaine catalytique de l'enzyme, est le domaine le plus conservé entre toutes les isoformes : c'est cette région qui est responsable de l'hydrolyse du PIP_2 (Wang et al., 1996). Les $\text{PLC}\gamma$ ont la particularité d'avoir deux domaines SH2 et un domaine SH3 entre les domaines X et Y du tonneau TIM. Ces domaines peuvent se lier à différents partenaires, comme par exemple EF-1alpha (translational elongation factor-1 alpha) (Kim et al., 1999a), les protéines Ras (Yablonski et al., 2001), et les tyrosine kinases (Chattopadhyay et al., 1999; Margolis et al., 1990; Meisenhelder et al., 1989). Le domaine C2 a particulièrement été étudié pour l'isoforme $\text{PLC}\delta 1$ et contient des sites de fixations au Ca^{2+} . Ce domaine permet également la liaison à la membrane via l'interaction avec des protéines et

phospholipides membranaires (Essen et al., 1996; Grobler and Hurley, 1998). Les PLC β et PLC η possèdent un domaine PDZ (Post synaptic density-95, Drosophila disc large tumor suppressor and Zonula occludens-1 protein) qui permet la fixation à d'autres protéines qui possèdent des motifs PDZ : c'est le cas de plusieurs protéines qui interviennent dans la signalisation cellulaire, l'assemblage de complexes macromoléculaires ou encore la régulation des RCPG (Dunn and Ferguson, 2015; Wang et al., 2010). Les PLC ϵ possèdent, en plus de la partie commune qu'elles ont avec les autres PLC, un domaine Ras GEF et deux domaines « Ras-binding », RA1 et RA2 sur le schéma. La fonction du domaine RA1 n'est pas encore claire, mais le domaine RA2 joue un rôle dans le recrutement à la membrane et l'activation des PLC ϵ via la liaison aux petites GTPases Rap et Ras (Bunney et al., 2006). Une fois les PLC ϵ activées, le domaine Ras GEF possède à son tour une activité GTPase pour la protéines Rap (Jin et al., 2001; Satoh et al., 2006). Ces deux protéines activées peuvent se fixer sur le domaine RA2 des PLC ϵ , et renforcer ainsi leur activation.

B. Distribution tissulaire

Les phospholipases C, en tant que protéines intervenant dans la génération de seconds messagers essentiels à la transmission de signaux cellulaires, sont présentes dans la plupart des cellules de l'organisme, avec néanmoins certaines répartitions spécifiques du tissu.

Suite à leur découverte, la PLC β 1 et la PLC β 4 ont surtout été retrouvées au niveau neural (Adamski et al., 1999; Homma et al., 1989). La PLC β 2 est plus largement exprimée dans les cellules du sang et la PLC β 3 est quant à elle exprimée de manière ubiquitaire (Gresset et al., 2012). La PLC γ 1 est une isoforme ubiquitaire tandis que la PLC γ 2 possède un tropisme pour les cellules sanguines (Suh et al., 2008). Les PLC δ 1, PLC δ 3 et PLC δ 4 sont présentées comme étant des isoformes largement ubiquitaires qui sont aussi bien exprimées dans le cerveau que dans le muscle squelettique, le cœur, les poumons ou les organes reproducteurs (Suh et al., 2008). La PLC ϵ est également une isoforme largement distribuée qui a été retrouvée notamment dans le foie, le cœur, les reins, le cerveau et les poumons (Kelley et al., 2001; Lopez et al., 2001; Song et al., 2001). La PLC ζ est uniquement retrouvée au niveau des testicules où elle exerce un rôle dans la fonction reproductrice (Nomikos et al., 2017a; Saunders et al., 2002). La PLC η 1 et la PLC η 2 sont les dernières PLC à avoir été découvertes en 2005 et sont décrites comme étant très exprimées dans le cerveau (Hwang et al., 2005a; Nakahara et al., 2005).

L'expression spécifique d'un tissu n'est toutefois pas déterminée, comme en témoigne une analyse du protéome humain qui s'intéresse à l'expression des phospholipases C dans 44 tissus provenant de 144 individus, via la base de données « The Human Protein Atlas » <https://www.proteinatlas.org/> (**Figure 12** et **Figure 11**).

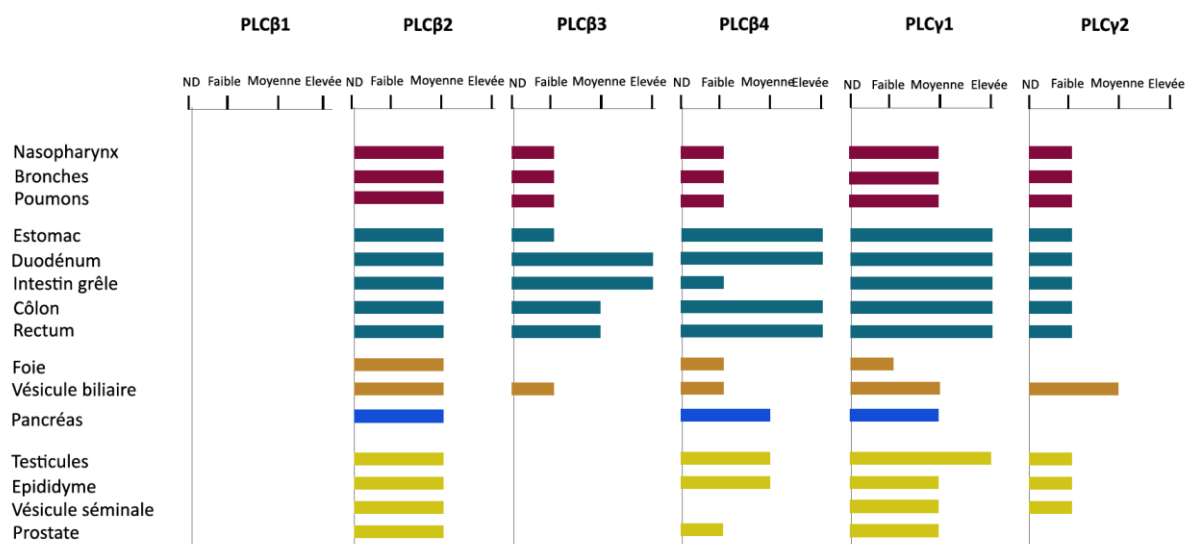


Figure 12 : Expression tissulaire des protéines PLCβ1, PLCβ2, PLCβ3, PLCβ4, PLCγ1 et PLCγ2 analysée par le projet « The Human Protein Atlas » dans les organes qui expriment CFTR

L'expression des six protéines a été étudiée par immunohistochimie dans plusieurs tissus provenant de 144 individus que constitue la base de données Suédoise « The human protein Atlas » : <https://www.proteinatlas.org/>. L'expression de chaque protéine s'échelonne de non détectée (ND) à élevée au sein des échantillons.

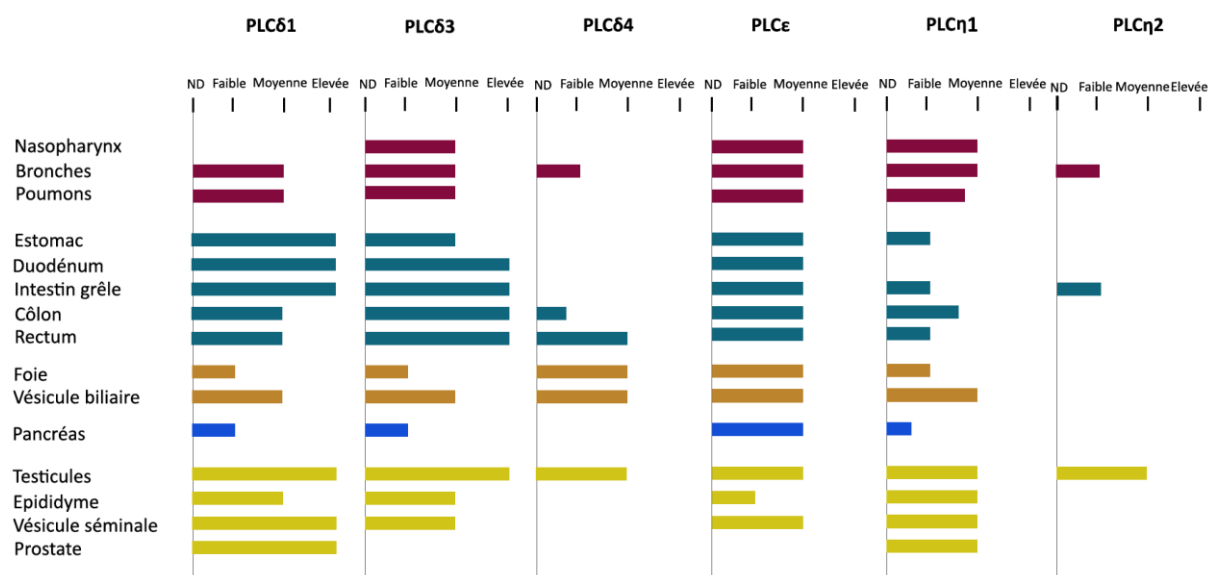


Figure 11 : Expression tissulaire des protéines PLCδ1, PLCδ3, PLCδ4, PLCε, PLCη1 et PLCη2 analysée par le projet « The Human Protein Atlas » dans les organes qui expriment CFTR

L'expression des cinq protéines a été étudiée par immunohistochimie dans plusieurs tissus provenant de 144 individus que constitue la base de données Suédoise « The human protein Atlas » : <https://www.proteinatlas.org/>. L'expression de chaque protéine s'échelonne de non détectée (ND) à élevée au sein des échantillons. Les données concernant la PLCη1 sont préliminaires car observées avec des anticorps en cours de validation, les données concernant les autres isoformes sont considérées comme fiables car observées avec des anticorps validés.

La PLC β 2 par exemple, qui a été décrite à l'origine comme étant très exprimée au niveau des cellules hématopoïétiques, est finalement exprimée dans un grand nombre de tissus. La PLC ζ n'est pas représentée sur les figures car elle est exprimée presque exclusivement au niveau de l'appareil reproducteur masculin.

En regard de cette base de données qui analyse l'expression protéique des PLC pour 144 individus, toutes les isoformes de phospholipases C, à l'exception de la PLC β 1, sont exprimées au niveau des principales cellules épithéliales qui expriment le canal CFTR, à savoir les cellules épithéliales du nasopharynx, des bronches, du tractus gastro-intestinal, du pancréas et du système reproducteur masculin.

C. Principales fonctions physiologiques dans l'organisme

Ainsi chez l'homme, les PLC ont une distribution très large au sein de l'organisme, si ce n'est ubiquitaire pour certaines isoformes. Elles sont dès lors impliquées dans un grand nombre de mécanismes physiologiques que nous allons aborder de manière non exhaustive dans cette partie.

Les PLC β interviennent dans la production de cytokines par les mastocytes (Xiao et al., 2011), la survie des macrophages (Wang et al., 2008b), l'inflammation de la peau (Ando et al., 2014), le syndrome myélodysplasique (Mongiorgi et al., 2012), la régulation des cellules hématopoïétiques où elles possèdent des propriétés antiproliférative (Xiao et al., 2009) et régulent également le fonctionnement des neutrophiles (Jiang et al., 1997; Li et al., 2000). Les PLC γ interviennent dans l'érythropoïèse (Liao et al., 2002), la régulation des lymphocytes T (Fu et al., 2010), la maturation des lymphocytes B (Hashimoto et al., 2000), l'inflammation (Yu et al., 2005) et la différenciation des ostéoclastes (Chen et al., 2008). Les PLC δ jouent un rôle dans la vascularisation du placenta (Nakamura et al., 2005), la fertilité (Fukami et al., 2003), le fonctionnement des cardiomyocytes (Nakamura et al., 2014), la différenciation des kératinocytes (Nakamura et al., 2003, 2008), la formation des ongles (Kiuru et al., 2011) et préviennent également les maladies inflammatoires de la peau telles que le psoriasis (Kanemaru et al., 2012). Les PLC ϵ interviennent dans le développement du cœur (Tadano et al., 2005), mais sont aussi impliquées dans l'hypertrophie cardiaque (Zhang et al., 2013), les maladies inflammatoires de la peau (Hu et al., 2010; Takenaka et al., 2011) et la neuro-inflammation (Dusaban et al., 2013, 2015). Le rôle de la PLC ζ est exclusivement relié à la fertilité (Matsu-Ura et al., 2019; Nomikos et al., 2017b; Rogers et al., 2004). Enfin, la fonction physiologique des PLC η n'est pas encore déterminée. Leur forte expression au niveau du système nerveux suggère un rôle dans la neurogénèse, la neurotransmission ainsi que dans les mécanismes d'apprentissages et de la mémoire. Pour autant, il a été montré que la perte de fonction de la PLC η chez la souris n'entraîne pas de malformations liées au développement cérébral (Kanemaru et al., 2010; Popovics and Stewart, 2012).

D. Voies d'activation

Toutes les phospholipases C, quelles que soient leur isoforme et la cellule considérée, vont produire du DAG et de l'IP₃. Elles montrent donc toutes la même activité enzymatique, mais leurs mécanismes d'activation seront différents selon l'isoforme considérée. A l'état basal, c'est-à-dire en absence de stimulation, les PLC ont toutes une activité relativement faible car elles subissent un mécanisme d'auto-inhibition exercé par la région qui sépare le domaine X du domaine Y au niveau de leur site catalytique : le linker X/Y. Cette région est très fortement chargée négativement et les modélisations en 3D ont montré qu'à l'état basal cette région entoure le site catalytique avec deux conséquences : i) les PLC ne peuvent pas accéder à la membrane car les charges négatives du linker X/Y et des phospholipides membranaires se repoussent mutuellement et ii) le site actif de l'enzyme n'est pas accessible pour l'hydrolyse du PIP₂ (Hicks et al., 2008). Suite à une activation, par exemple par les protéines G ou le Ca²⁺, les PLC sont recrutées à la membrane via leur domaine PH. Une fois que les PLC sont ancrées à la membrane, les phospholipides membranaires peuvent repousser le linker X/Y, ce qui libère le site catalytique et permet l'hydrolyse du PIP₂ (**Figure 13**). Comme les phospholipases C sont toutes auto-inhibées via leur linker X/Y, nous orienterons davantage ce chapitre sur les voies d'activation des différentes isoformes.

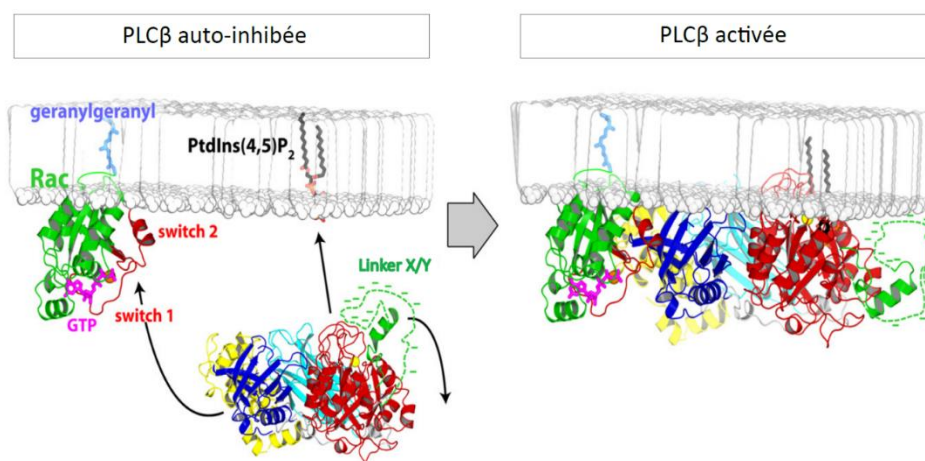


Figure 13 : Auto-inhibition des phospholipases C : exemple avec la PLCβ2

La PLCβ2 est inactivée au niveau basal avec son linker X/Y (vert) qui entoure le site catalytique (rouge) et entrave l'hydrolyse du PIP₂. La protéine Rac recrute la PLCβ2 à la membrane via son domaine PH (bleu), le linker X/Y se voit alors repoussé par les charges négatives des phospholipides membranaires, libérant ainsi le site catalytique et permet la formation de DAG et d'IP₃. (Hicks et al., 2008)

1. Les phospholipases C β

Les PLCβ sont généralement activées par des protéines Gα et Gβγ à la suite de la stimulation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Toutes les PLCβ (PLCβ₁₋₄) sont activées par les protéines

Gαq (Jhon et al., 1993; Lee et al., 1994; Smrcka and Sternweis, 1993). Les PLCβ1, PLCβ2 et PLCβ3 répondent également à une stimulation par les protéines Gβγ (Boyer et al., 1992; Camps et al., 1992), mais ce n'est pas le cas pour la PLCβ4 (Lee et al., 1994). Ainsi l'histamine, le thromboxane A₂, l'UTP, la bradykinine, la ghréline, pour en citer quelques-uns, sont des ligands endogènes des RCPG susceptibles d'activer les PLCβ via les protéines Gq tandis que la somatostatine, les opioïdes, la mélatonine et l'ADP sont d'autres ligands susceptibles, quant à eux, d'activer les PLCβ via les protéines Gβγ (Exton, 1996; Wettschureck and Offermanns, 2005). Il est également décrit que la protéine Rac qui appartient à la famille des RhoGTPases est aussi capable d'activer la PLCβ2 (Illenberger et al., 1998). Enfin, il est décrit que l'activité des PLCβ₁₋₃ est régulée négativement par phosphorylations sous l'action de la protéine kinase A, la protéine kinase C et la protéine kinase G (Litosch, 2002).

2. Les phospholipases C γ

Les PLCγ sont activées majoritairement par des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) et les deux isoformes, PLCγ1 et PLCγ2, sont activées de la même manière : la fixation de ligands au niveau des RTKs entraîne la dimérisation des récepteurs et leur autophosphorylation par les tyrosines. Les RTKs peuvent ensuite établir des liaisons avec des protéines qui possèdent des domaines SH2, comme c'est le cas pour les PLCγ, et les phosphoryler. Cette dernière étape induit un changement de conformation des PLCγ et une libération du site actif de l'enzyme (**Figure 14**) (Gresset et al., 2010).

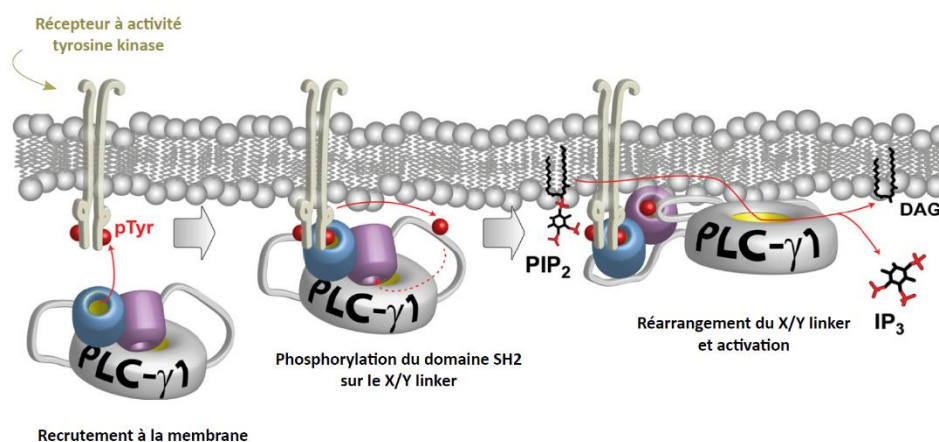


Figure 14 : Activation des PLCγ par les récepteurs à activité tyrosine kinase : exemple avec la PLCγ1

Suite à la phosphorylation des récepteurs à activité tyrosine kinase, le premier domaine SH2 qui compose le X/Y linker sur la PLCγ1 se lie au récepteur. Le récepteur phosphoryle ensuite la PLCγ1 au niveau d'une tyrosine spécifique, ce qui induit un réarrangement de la protéine et la libération de son site catalytique (Gresset et al., 2010).

De cette façon, l'IGF-1, le VEGF ou le PDGF sont quelques-uns des ligands des récepteurs à activité tyrosine kinase qui sont susceptibles d'activer les PLC γ . Bien qu'il n'est pas encore été rapporté que les PLC γ puissent être phosphorylées directement par des tyrosines kinases cytosoliques, il a toutefois été décrit qu'elles peuvent être stimulées par des récepteurs dépourvus d'activité tyrosine kinase mais qui, par cascades de phosphorylations et recrutements de partenaires protéiques, entraînent en bout de chaîne l'activation des PLC γ (Gresset et al., 2012). Deux autres façons d'activer les PLC γ sans passer par les tyrosines kinases ont été rapportées. La phosphatidylinositol-3-kinase, qui permet la production de PI(3,4,5)P₃, active les PLC γ via sa liaison au domaine SH2 (Bae et al., 1998), et la protéine Rac entraîne l'activation de la PLC γ 2 via sa liaison avec le domaine spPH qui est situé au niveau du X/Y linker des PLC γ (**Figure 10**) (Piechulek et al., 2005; Walliser et al., 2008).

3. Les phospholipases C δ

L'activité des PLC δ est très largement liée à l'activité calcique intracellulaire, et la PLC δ 1 est l'isoforme la plus sensible au Ca²⁺. En effet, l'unique régulateur des PLC δ identifié pour le moment est le Ca²⁺ (Kim et al., 1999b) or les PLC δ régulent également, par des phénomènes de rétrocontrôles, l'homéostasie calcique en inhibant l'activité de canaux sensibles au calcium activés par le PIP₂ (**Figure 15**).

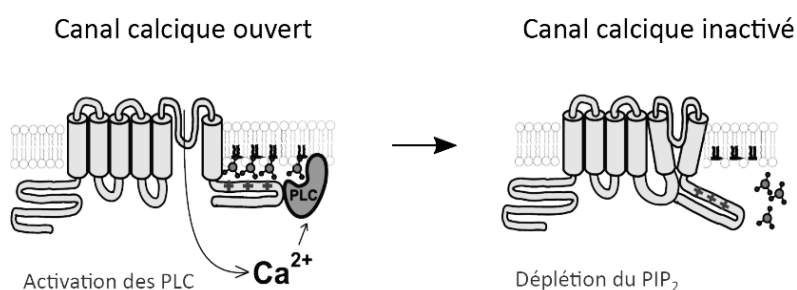


Figure 15 : Régulation des canaux TRP par les phospholipases activées par le Ca²⁺

L'influx calcique qui transite par les TRP va activer des PLC sensibles au Ca²⁺, comme les PLC δ , avec comme conséquence l'hydrolyse du PIP₂ et un rétrocontrôle du canal. Ce type de rétrocontrôle a été observé pour les canaux TRPM8, TRPV1, TRPV2 et TRPV6 (Rohacs, 2013).

La PLC δ 1 peut être activée à des concentrations en Ca²⁺ allant de 0,1 μ M à 10 μ M qui correspondent à des concentrations cellulaires physiologiques (Allen et al., 1997). Toute stimulation susceptible d'augmenter le Ca²⁺ intracellulaire peut donc entraîner une activation des PLC δ . Ainsi, la stimulation de RCPG qui mobilisent le Ca²⁺ (Nash et al., 2001), ou de canaux calciques comme TRPV1 (Rohacs, 2015), Orai (Thompson and Shuttleworth, 2011), TRPM8 (Li et al., 2011), TRPV2 (Mercado et al., 2010)

ou TRPV6 (Thyagarajan et al., 2008), conduisent à l'activation des PLC δ . Paradoxalement, l'expression de la PLC δ 3 est régulée négativement par le Ca²⁺ et l'AMPc (Lin et al., 2001).

À leur tour les PLC δ régulent l'activation de différents canaux calciques. Ainsi les PLC activées par le Ca²⁺ régulent positivement les canaux TRPC4 (Thakur et al., 2016), TRPC3, TRPC6 et TRPC7 (Lemonnier et al., 2008) et négativement les canaux TRPV6 (Thyagarajan et al., 2009; Velisetty et al., 2016), TRPV2 (Mercado et al., 2010), TRPM8 (Daniels et al., 2009; Rohács et al., 2005) et TRPV1 (Lukacs et al., 2013).

4. Les phospholipases C ϵ

Les PLC ϵ sont activées par les petites protéines GTPases Rho, Rap, Rac et Ras, qui sont elles-mêmes activées soit par des récepteurs à activité tyrosine kinase, soit par des RCPG. Ainsi l'EGF (epidermal growth factor en anglais) (Song et al., 2001), le PDGF (platelet-derived growth factor en anglais) (Song et al., 2002) ou l'IGF (insulin-like growth factor en anglais) (Zhang et al., 2011), conduisent à l'activation des PLC ϵ par fixation à leur récepteur à activité tyrosine kinase respectif. De même, un certain nombre de ligands des RCPG, parmi lesquels l'acide lysophosphatidique, la thrombine, la sphingosine-1-phosphate, ou encore l'isoprénaline entraînent l'activation des PLC ϵ via les petites GTPases (Kelley et al., 2004; Zhang et al., 2011). Les petites GTPases stimulent les PLC ϵ de deux manières : par fixation directe au niveau du domaine RA2 ou par fixation sur une autre partie de la protéine. Nous entendons de plus en plus parler dans la littérature de la protéine EPAC (exchange protein directly activated by cAMP) qui a été découverte il y a une dizaine d'années et qui est un facteur d'échange de nucléotide guanyliques. Cette protéine est activée par l'AMPc et entraîne la dissociation du nucléotide GDP sur la protéine Rap pour favoriser la liaison de Rap au nucléotide GTP qui représente la forme active de Rap. Par l'intermédiaire de cette transformation Rap est capable d'activer la PLC ϵ . Ces dernières années, beaucoup d'importance a été accordé à la voie d'activation de la PLC ϵ par EPAC : il a notamment été rapporté que EPAC activait la PLC ϵ dans les neurones (Tong et al., 2017), dans les cellules entéro-endocrine (Bala et al., 2014), et dans les cardiomyocytes (Oestreich et al., 2009).

5. Les phospholipases C ζ et η

Les PLC ζ sont activées par le Ca²⁺ intracellulaire, elles possèdent même une sensibilité au Ca²⁺ qui est supérieure de vingt fois à celle de la PLC δ 1 (Kouchi et al., 2004). Les PLC ζ ont été identifiées pour le moment exclusivement dans les spermatides et la régulation de cette enzyme est encore peu documentée.

Les PLC η sont également très sensible au Ca²⁺ et sont donc activées par une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire (Kim et al., 2011a; Popovics et al., 2011). Il a également été montré que ces PLC peuvent

être activées par les protéines G $\beta\gamma$, ce qui suggère que la stimulation des RCPG constitue un autre moyen de les activer (Zhou et al., 2008).

E. Fonction des phospholipases C dans les voies respiratoires

Les phospholipases C ont été largement étudiées dans la physiopathologie pulmonaire. Cependant, peu d'études se sont intéressées à ces protéines dans le contexte de la mucoviscidose. Dans le but d'identifier les isoformes de phospholipase C qu'il est pertinent d'étudier dans le poumon, nous avons rassemblé dans cette partie les études qui ont porté sur la physiologie/physiopathologie associée aux phospholipases C dans les voies respiratoires.

1. Rôle des PLC dans la physiologie du poumon

Il a été montré que le développement normal du poumon au stade fœtal est sous la dépendance de l'EGF et passe par l'activation des PLC γ (Ramadurai et al., 2003). La PLC δ 1, d'autre part, régule négativement l'influx calcique qui transite via TRPV6 dans les cellules épithéliales bronchiques 16HBE (Vachel et al., 2015). Enfin, il a été identifié que l'activation de la PLC γ 1 entraîne une diminution de l'expression des protéines claudine-2 et ZO-1, deux protéines qui forment les jonctions serrées, via l'activation de la PKC α dans des cellules épithéliales bronchiques (16HBE) (Xu et al., 2013). La PLC γ 1 diminue donc la formation des jonctions serrées et augmente ainsi la perméabilité cellulaire au niveau bronchique.

2. Bronchopneumopathies chroniques obstructives, asthme et inflammation

L'air froid est mis en cause dans les bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO) et l'asthme car il entraîne une augmentation des infections bactériennes et virales pulmonaires, la production des facteurs de l'inflammation et la sécrétion de mucus. Le canal TRPM8, qui est activé par des températures inférieures à 26°C, est mis en cause dans ces phénomènes pathologiques via l'activation de la PLC δ 1 (Li et al., 2011). En effet la stimulation par le menthol, un agoniste du canal TRPM8, ou par le froid induit une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire qui transite par TRPM8 associée à l'activation de la PLC δ 1 et à l'augmentation de la protéine MUC5AC, protéine majoritairement impliquée dans la sécrétion de mucus, dans les cellules épithéliales bronchiques humaines NHBE. La PLC γ 2 est une autre isoforme de PLC également associée aux phénomènes inflammatoires de l'épithélium pulmonaire. En effet, il a été observé qu'au cours d'un épisode inflammatoire, le facteur de nécrose tumorale (TNF α) stimulait la cyclooxygénase 2 (COX-2) et le NF- κ B avec comme conséquence la production de cytokines inflammatoires par une voie impliquant la PLC γ 2 et la PKC α

dans les cellules épithéliales pulmonaires NCI-292 (Chen et al., 2000). Par ailleurs, la PLC ϵ est considérée comme un médiateur de l'inflammation vasculaire au niveau du poumon. Des souris PLC $\epsilon^{-/-}$ traitées par une inhalation de lipopolysaccharide (LPS) bactérien présentent une diminution de la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires dans le poumon tels que l'IL-1 β , l'IL-6 ou le TNF α (Bijli et al., 2016).

L'asthme est une maladie chronique inflammatoire caractérisée par une obstruction des voies respiratoires, associée à une inflammation, une production de cytokines inflammatoires et une augmentation de la production de mucus par l'épithélium pulmonaire (Holgate, 2012). Les phénomènes moléculaires responsables de l'asthme au niveau des muscles lisses respiratoires ont été étudiés et la PLC β 2 a été impliquée dans la symptomatologie associée à cette maladie (André-Grégoire et al., 2017). En effet, André-Grégoire et ses collaborateurs ont montré que la stimulation des récepteurs muscariniques provoque une activation de la protéine Rac1 qui entraîne la stimulation de la PLC β 2, conduisant à une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire et à une bronchoconstriction dans les cellules musculaires lisses des voies respiratoires humaines aSMC (en anglais « airway smooth muscle cells »). La galangine et la fisétine sont deux alcaloïdes aux propriétés anti-inflammatoires proposées comme traitement de l'asthme (Huang et al., 2018; Liu et al., 2015b; Zha et al., 2013) et qui exercent leur action via l'inhibition des phosphodiestérases mais aussi de la PLC β (Brown et al., 2016). La PLC ϵ est aussi incriminée dans la physiopathologie de l'asthme puisqu'il a été montré que des modèles murins d'asthme, modifiés génétiquement pour exprimer une forme inactive de PLC ϵ , produisent un nombre de leucocytes (éosinophiles, neutrophiles, macrophages et lymphocytes) et de cytokines pro-inflammatoires (IL-4, IL-5, IL-13 et IFN γ) diminué par rapport au même modèle de souris qui expriment la forme active de la PLC ϵ (Nagano et al., 2014).

Ainsi la PLC β 2 et la PLC ϵ favorisent l'asthme, et à l'inverse, il a été montré que la PLC γ 1 et la PLC δ 1 interviennent dans la diminution de cette pathologie. En effet, dans un modèle murin d'asthme, la PLC γ 1 participe à la diminution de la réponse Th2, qui correspond à la réaction allergique, et qui est suractivée dans l'asthme (Chen et al., 2017). Par ailleurs, la diminution de l'hypertrophie des cellules musculaires lisses des voies respiratoires suite à l'effet des glucocorticoïdes indiqués pour diminuer l'inflammation dans l'asthme, agit notamment via la PLC δ 1. En effet, l'augmentation de l'expression de la PLC δ 1 dans ces cellules entraîne une diminution significative de l'hypertrophie (Sasse et al., 2017).

III. Intérêt des phospholipases C dans la mucoviscidose

Nous allons voir dans cette dernière partie que les produits de la réaction enzymatique des phospholipases C (le DAG et la PKC), au même titre que les phospholipases C, augmentent l'activité du canal CFTR et plus généralement la sécrétion chlorure (**Figure 16**).

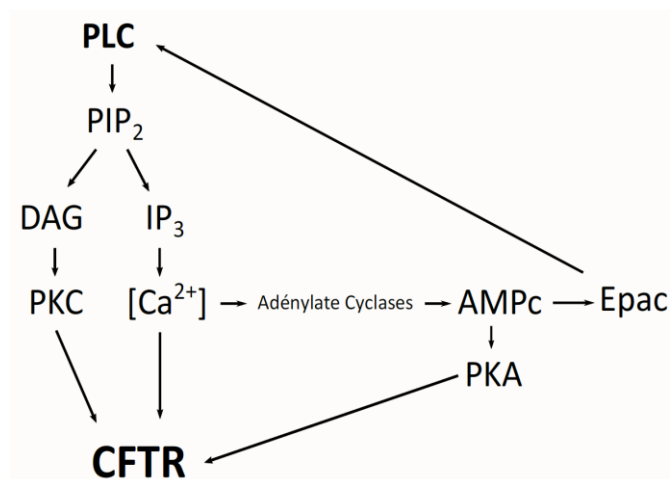


Figure 16 : Schéma représentant les acteurs cellulaires en lien avec les phospholipases C

PLC : phospholipases C, PIP_2 : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate, DAG : diacylglycérol, IP_3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, PKC : protéine kinase C, Epac : exchange protein directly activated by cAMP.

A. Les substrats et les produits de la réaction enzymatique des phospholipases C modulent le canal CFTR

Dans cette partie nous allons présenter des maillons intermédiaires entre les PLC et le canal CFTR. Il s'agit de protéines et de phospholipides qui modulent la fonction du canal CFTR, de même que son expression ou sa stabilisation à la membrane, via des mécanismes de phosphorylations ou d'interactions protéiques.

1. La protéine kinase C

La protéine kinase C (PKC) contrôle la phosphorylation de différents effecteurs cellulaires. En réalité sous le terme de protéine kinase C se regroupe toute une famille de protéine kinase membranaire, qui comprennent 12 isoformes chez les mammifères (Mellor and Parker, 1998). En premier a eu lieu la découverte des $PKC\alpha$, $PKC\beta$ et $PKC\gamma$. Trois autres PKC ont par la suite été caractérisées : les $PKC\delta$, $PKC\epsilon$ et $PKC\zeta$ (Ono et al., 1987). Trois ans plus tard, trois nouvelles isoformes ont été identifiées : les $PKC\eta$, $PKC\theta$ et $PKC\iota$ (Osada et al., 1990, 1992; Selbie et al., 1993). Enfin les PKN1, PKN2 et PKN3 (en anglais

« PKC-related kinases ») ont été identifiées (Mukai and Ono, 1994; Palmer et al., 1995). Sur la base de leur propriétés enzymatiques, ces différentes isoformes ont été regroupées en 4 sous-famille : les cPKC (pour classical isoforms en anglais) regroupent les PKC α , PKC β et PKC γ ; les nPKC (pour novel isoforms en anglais) regroupent les PKC δ , PKC ϵ , PKC η et PKC θ ; les aPKC (pour atypical isoforms en anglais) ; et enfin les PKN (pour PKC-related kinases en anglais) regroupent les PKN1, PKN2 et PKN3 (Rosse et al., 2010) (**Figure 17**).

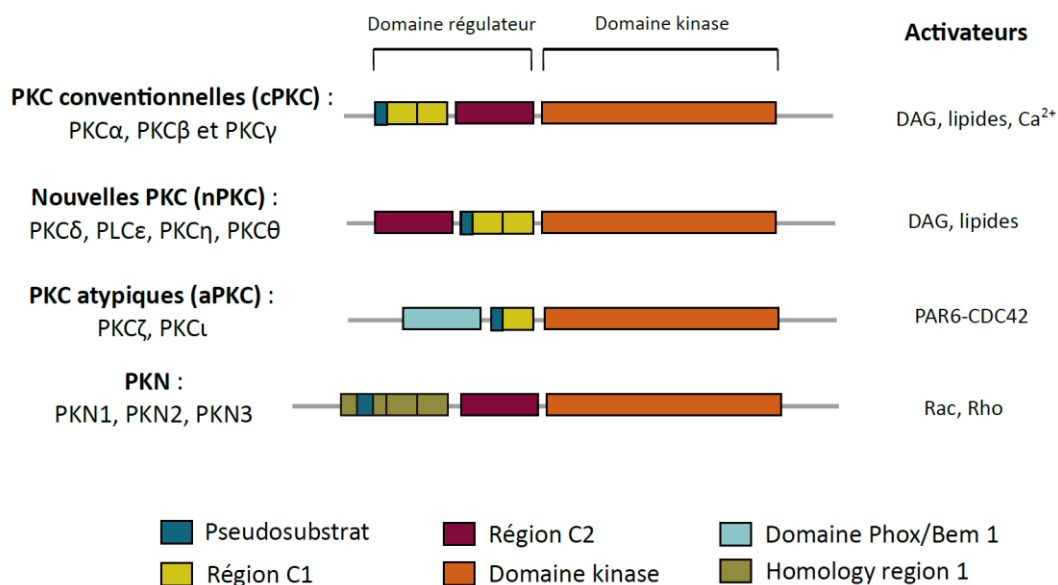


Figure 17 : Structure des différentes isoformes de PKC

Les PKC conventionnelles, les nouvelles PKC, les PKC atypiques et les PKN possèdent un domaine kinase commun au niveau C-terminal qui constitue le site de phosphorylation des PKC. Le domaine C1 situé sur les cPKC et nPKC correspond au site de liaison au DAG et le domaine C2 correspond au site de liaison des phospholipides et du Ca²⁺. Les PKC atypiques sont activées par la liaison du complexe PAR-CDC42 au niveau du domaine Phox/Bem 1 et les PKN sont activées par les petites GTPases via le domaine homology region 1 (Lučić et al., 2016; Rosse et al., 2010).

De la même façon que les PLC, les PKC sont auto-inhibées à l'état basal via leur domaine régulateur (Pears et al., 1990). Ainsi les PKC conventionnelles sont activées par la fixation du Ca²⁺ et de phospholipides au niveau de leur domaine C2, puis par la fixation du DAG au niveau de leurs domaines C1 (**Figure 18**) (Rosse et al., 2010). Les nouvelles PKC sont également activées par le DAG ou les phospholipides par fixation sur les domaines C1 mais ne sont pas sensibles au Ca²⁺ (Mellor and Parker, 1998). Les PKC atypiques sont quant à elle activées par interactions avec le complexe PAR6-CDC42 (Suzuki et al., 2001). Enfin les PKN sont stimulées par la famille des Rho-GTPases (Lim et al., 2006; Shibata et al., 1996). Par ailleurs les PKC peuvent également être activées via des liaisons avec des

partenaires cellulaires spécifiques. Ainsi, parmi les familles de PKC qui peuvent être activées par les produits de l'hydrolyse du PIP₂ par les PLC, à savoir le DAG et le Ca²⁺, nous retrouvons les PKC conventionnelles ainsi que les nouvelles PKC.

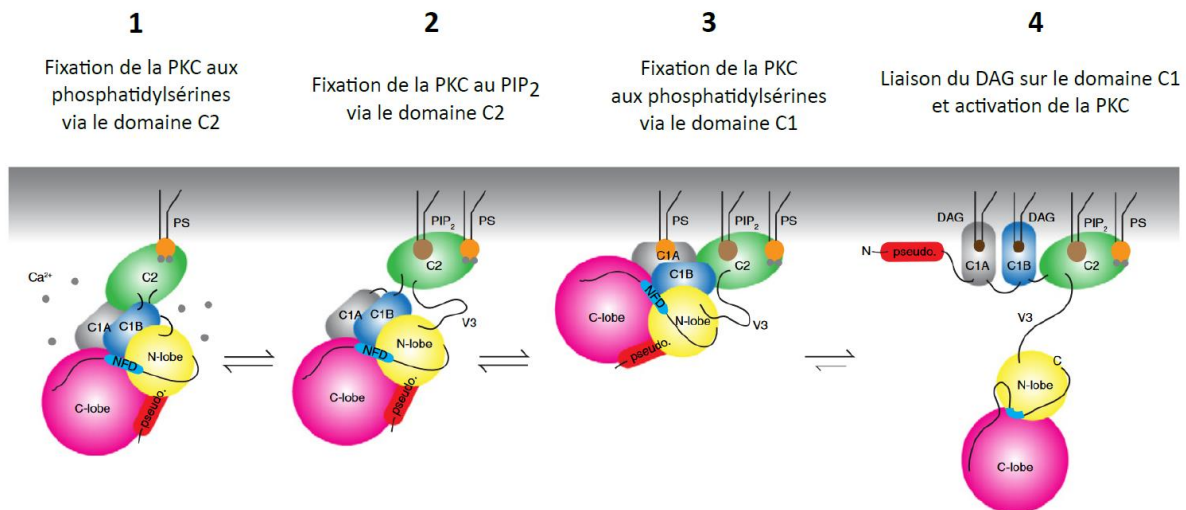


Figure 18 : Activation de la PKC par le DAG : exemple avec les PKC conventionnelles

1 : les domaines régulateurs C1 et C2 sont rassemblés autour du domaine kinase pour former une structure compacte non activée. Le Ca²⁺ engage la fixation de la PKC à la membrane en permettant la liaison des phosphatidylsérines au niveau du domaine C2. **2** : la PKC se fixe ensuite au PIP₂ membranaire, également via son domaine C2. **3** : la PKC se fixe subséquentement, par des interactions électrostatiques, aux phosphatidylsérines membranaires via son domaine C1. **4** : l'activation de la PKC a lieu par la fixation du DAG au niveau du domaine C1 de l'enzyme (Lučić et al., 2016).

La PKC active le canal CFTR

Parmi les protéines kinases qui régulent le canal CFTR, la PKA conserve le rôle prépondérant, mais la PKC joue néanmoins un rôle dans l'activation du canal via des phosphorylations au niveau du domaine R et du NBD1 (Chappe et al., 2003; Picciotto et al., 1992). En effet, à elle seule, la PKC entraîne une faible activation du canal CFTR (Berger et al., 1993; Tabcharani et al., 1991). En revanche elle potentialise l'activation du canal lorsqu'elle est associée avec la PKA (Chappe et al., 2003, 2004; Jia et al., 1997; Seavilleklein et al., 2008). Il a également été montré que la PKC intervient dans l'expression membranaire du canal CFTR induite par le VIP (Vasoactive intestinal peptide en anglais) (Chappe et al., 2008).

Comme il existe plusieurs isoformes de PKC, nous avons regardé plus précisément lesquelles sont impliquées dans l'activation du canal CFTR. Liedtke et al. ont identifié, dans les cellules épithéliales pulmonaires Calu-3, la présence des PKC α , PKC β_2 , PKC δ , PKC ϵ et PKC ζ (Liedtke and Cole, 1998). De plus,

la génération d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre les isoformes δ , ϵ et ζ a révélé une implication de la PKC ϵ mais pas des deux autres isoformes dans l'activation du canal CFTR-WT par l'épinéphrine (Liedtke and Cole, 1998; Liedtke et al., 2001). L'équipe a également montré que l'oligonucléotide anti-sens dirigé contre la PKC ϵ , s'il diminue l'activation de CFTR, n'altère pas l'activité de la PKA. Ceci suggère que la PKC ϵ exerce un rôle dans l'activation de CFTR qui n'est pas lié à l'activité de la PKA. Ce qui est intéressant à noter c'est que la PKC ϵ est également présente dans la lignée épithéliale CF/T43 homozygote pour la mutation CFTR-F508del (Liedtke and Cole, 2000). Cette PKC pourrait donc également jouer un rôle dans l'activité de la protéine CFTR-F508del corrigée à la membrane.

Les PKC peuvent aussi jouer un rôle dans la sécrétion chlorure dépendante du canal CFTR en favorisant son expression. Par exemple il a été mis en évidence chez la souris que les PKC β 1 jouent un rôle dans l'expression de CFTR et la sécrétion chlorure dépendante de CFTR (Umar et al., 2000a, 2000b). De même, la PKC ϵ permet l'expression apicale de la protéine CFTR-WT et CFTR-F508del par le VIP (Alcolado et al., 2011; Alshafie et al., 2014).

Il semblerait que parmi toutes les isoformes de PKC ce soit majoritairement la PKC ϵ qui est impliquée dans l'activation du canal CFTR.

2. La protéine Epac (exchange protein directly activated by cAMP)

La protéine Epac est un facteur d'échange de nucléotide guanylique activé par l'AMPc (Kawasaki et al., 1998; de Rooij et al., 1998, 2000). Il s'agit d'une protéine d'intérêt dans notre étude car elle active la PLC ϵ (**Figure 19 A**) (vom Dorp et al., 2004; Evellin et al., 2002; Schmidt et al., 2001) et elle est impliquée dans la sécrétion chlorure dans les cellules qui expriment la protéine CFTR (Domingue et al., 2016; Ivonnet et al., 2015; Lérias et al., 2018).

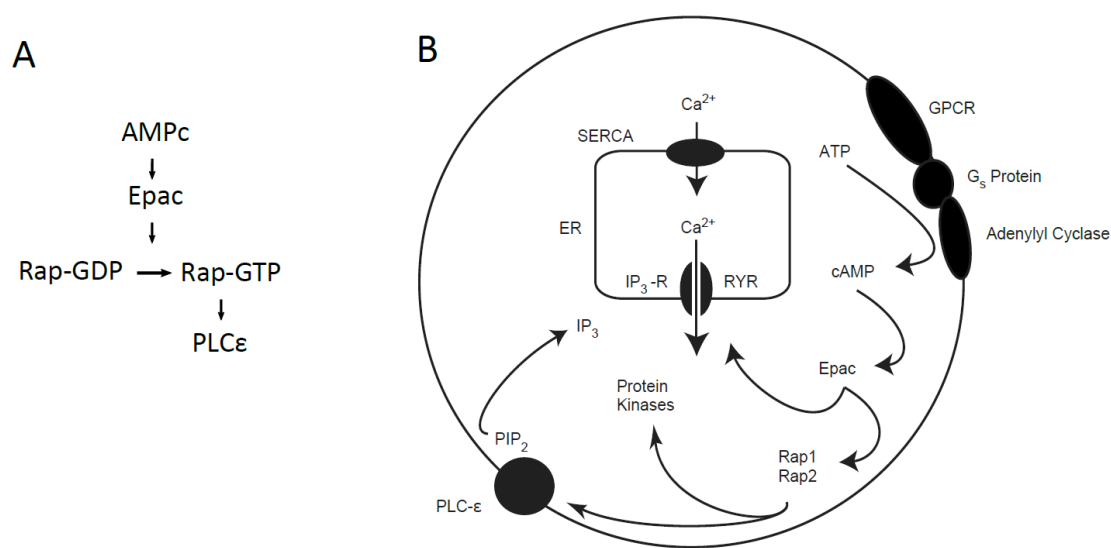


Figure 19 : La protéine Epac contrôle l'homéostasie calcique cellulaire

A : la protéine Epac intervient dans l'activation de la PLCε. La protéine Epac est activée par l'AMPc, elle échange une molécule de GDP par une molécule de GTP sur la protéine Rap-GTPase. La protéine Rap ainsi activée entraîne l'activation de la PLCε. **B** : la protéine Epac contrôle l'homéostasie calcique cellulaire sous la dépendance de l'APMc. Ainsi, elle facilite la sortie de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique et favorise l'hydrolyse du PIP_2 via l'activation de la PLCε (Holz et al., 2006).

Epac1 et Epac2 sont deux isoformes de la protéine exprimées de manière ubiquitaire dans l'organisme et que l'on retrouve au niveau des poumons (Schmidt et al., 2013). Après activation par l'AMPc, les protéines Epac activent les petites protéines GTPases telles que Rho, Rap, Rac et Ras qui activent à leur tour des effecteurs cellulaires comme la PLCε, mais aussi la voie des MAP kinases (en anglais « mitogen-activated protein kinase ») ou la voie mTOR (en anglais « mechanistic target of rapamycin ») (Misra and Pizzo, 2012; Ster et al., 2007). De ce fait, les protéines Epac contrôlent des phénomènes variés en passant par la régulation de l'homéostasie calcique via, entre autre, l'activation des PLCε (**Figure 19 B**) (Evellin et al., 2002; Schmidt et al., 2001) jusqu'à la différenciation cellulaire (Bryn et al., 2006; Shi et al., 2006), la formation des jonctions cellulaires (Cullere et al., 2005; Somekawa et al., 2005) ou encore la régulation de canaux ioniques tels que les canaux potassiques sensibles à l'ATP, les canaux $\text{Ca}_v3.1$ et le canal ENaC (Helms et al., 2006; Kang et al., 2006; Novara et al., 2004). Nous avons également recensé dans la littérature des exemples de régulation de canaux chlorure par la protéine Epac qui feront l'objet du prochain paragraphe.

Domingue et ses collègues ont montré que l'activation du courant CFTR-dépendant, par la forskoline ou les acides biliaires désoxycholique et chénodésoxycholique dans les cellules coloniques T84, est respectivement diminuée de 70 % et de 85 % lorsque la protéine Epac est inhibée par son inhibiteur

spécifique ESI-09 (Ao et al., 2013; Domingue et al., 2016). De façon similaire, Ivonnet et ses collègues ont observé que l'activation du courant CFTR-dépendant, soit par le peroxyde d'hydrogène, soit par une augmentation de calcium intracellulaire dans les cellules épithéliales bronchiques humaines, est également réduite d'environ 80 % lorsque la protéine Epac est inhibée (Ivonnet et al., 2015). Enfin, Lérias et ses collègues ont également montré que dans les cellules épithéliales bronchiques CFBE qui sur-expriment la protéine CFTR-WT ou la protéine CFTR-F508del, la protéine Epac intervient dans le courant chlorure activé par la forkoline mais également par l'ATP et la ionomycine (Lérias et al., 2018). De plus, l'existence d'un lien étroit entre CFTR et la protéine Epac a été mis en évidence. En effet, il a été montré que la protéine Epac 1 colocalise avec la protéine CFTR-WT et avec la protéine CFTR-F508del dans les cellules épithéliales bronchiques CFBE (Lobo et al., 2016). Par ailleurs, cette équipe a montré que l'activation de la protéine Epac 1 par son activateur, le 007-AM, stabilise le canal CFTR à la membrane, via une augmentation de l'interaction entre CFTR et NHERF1. L'ensemble de ces études révèle ainsi le rôle de la protéine EPAC, et donc potentiellement celui de son effecteur, la PLC ϵ , dans la sécrétion chlorure dépendante de CFTR.

3. Le PIP₂

Nous avons vu dans cette introduction que les produits de l'hydrolyse du PIP₂ par les phospholipases C, à savoir le Ca²⁺ intracellulaire, le DAG et la PKC, agissent tous en faveur d'une activation du canal CFTR. Nous allons maintenant aborder le rôle du PIP₂, constituant fondamental parmi les lipides membranaires et substrat des phospholipases C, dans la régulation du canal CFTR.

Le PIP₂ intervient dans la régulation de canaux ioniques. Ainsi il a d'abord été observé que les canaux potassiques ATP-dépendants (K-ATP), tout comme l'échangeur sodium-calcium exprimé au niveau cardiaque, sont régulés positivement par le PIP₂ et au contraire négativement par les phospholipases C β (Hilgemann and Ball, 1996). Ensuite, Hilgemann et ses collègues ont montré que les canaux potassiques rectifiant entrants, tels que GIRK1/4, GIRK2, IRK1 et ROMK, sont aussi activés par le PIP₂ via une interaction directe (Huang et al., 1998). Enfin, le PIP₂ régule le canal ENaC en augmentant, d'une part, la probabilité d'ouverture du canal et, d'autre part, le nombre de canaux activés (Yue et al., 2002).

A l'instar de ces canaux, il a été montré par des expériences de patch-clamp que le phosphatidylinositol et certains phosphoinositides (dérivés phosphorylés du phosphatidylinositol), participent à la régulation du canal CFTR. Ainsi le phosphatidylinositol (PI), le phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) et le PIP₂ activent tous les trois le canal CFTR non phosphorylé en présence d'ATP, avec une activation beaucoup plus importante, toutefois, pour le PIP₂ que pour les

deux autres phosphoinositides (Himmel and Nagel, 2004). Si l'on compare l'activation du canal CFTR par 10 μM de PIP_2 (150 pico ampères) à l'activation par 100 U/mL de PKA (800 pico ampère), nous constatons que l'activation de CFTR par le PIP_2 n'est cependant pas comparable à celle de la PKA, car environ cinq fois plus faible. Le mécanisme d'activation du canal CFTR par le PIP_2 n'a pas été clairement établi mais il semblerait qu'il n'y ait pas de phosphorylations par des protéines kinases. En effet, en absence d'ions divalents, le PIP_2 est encore capable d'activer le canal CFTR. Sachant que les ions divalents sont nécessaires à l'activité des protéines kinases, Himmel et ses collègues supposent que l'activation du canal CFTR par le PIP_2 ne passe pas par un mécanisme de phosphorylation, et suggèrent plutôt une interaction directe entre le canal CFTR non phosphorylé et le PIP_2 . Toutefois, si le canal CFTR non phosphorylé est activé par le PIP_2 , il est en revanche inhibé par ce phospholipide membranaire lorsqu'il est précédemment phosphorylé par la PKA (Himmel and Nagel, 2004).

Récemment une équipe a mis en évidence que le PIP_2 est un acteur essentiel dans la correction de la protéine CFTR-F508del à la membrane plasmique (Abbattiscianni et al., 2016). Ainsi, il a été montré que le PIP_2 , via sa fixation avec le cytosquelette, stabilise la protéine F508del-CFTR à la membrane (Abbattiscianni et al., 2016). En effet, l'activation de l'eitrine, une protéine de liaison au cytosquelette, et son recrutement à la membrane plasmique requièrent i) la phosphorylation d'un résidu sérine au niveau de son site de fixation à l'actine (Bretscher et al., 2002) ainsi que ii) son interaction avec le PIP_2 au niveau de son extrémité N-terminale (Barret et al., 2000; Yonemura et al., 2002). Par ailleurs, la diminution du PIP_2 , induite par l'activation des phospholipases C, diminue la localisation membranaire de l'eitrine (Hao et al., 2009). Or il existe des différences de localisation de la protéine eitrine lorsque le canal CFTR est muté ou non. Ainsi dans les cellules 16HBE14o- qui expriment la protéine CFTR-WT, la protéine eitrine est localisée au niveau apical des cellules tandis que dans les cellules CFBE41o- qui expriment la protéine CFTR-F508del, elle possède une expression cytosolique (Favia et al., 2010). De plus, il a été montré que la phosphorylation de l'eitrine et sa liaison au PIP_2 sont nécessaires pour obtenir une expression membranaire de la protéine CFTR-F508del, la stabiliser à la membrane, et favoriser son activité suite à une stimulation par la PKA (Abbattiscianni et al., 2016). Les auteurs suggèrent que ces deux mécanismes, à savoir la liaison du PIP_2 à l'eitrine et la phosphorylation de cette dernière, augmentent la liaison du canal CFTR au cytosquelette.

Ainsi le PIP_2 intervient dans la stabilisation à la membrane plasmique et l'activation du canal CFTR. Il s'agit d'un acteur intéressant à étudier dans le but de potentialiser l'activité de la protéine CFTR. Même si le niveau de PIP_2 , dans les cellules de lignées qui expriment la protéine CFTR mutée ou dans des cellules issues de patients atteints de mucoviscidose, n'est pas différent de celui observé dans des cellules contrôles de lignées qui expriment la protéine CFTR normale ou des cellules issues de sujets

sains (Cohn et al., 1988; Vachel et al., 2015), l'augmentation de la biosynthèse de ce lipide pourrait entraîner des conséquences bénéfiques sur la protéine CFTR-F508del (**Figure 20**).

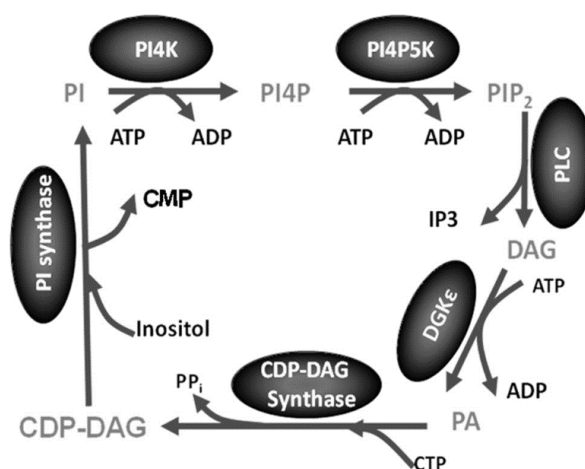


Figure 20 : Cycle des phosphoinositides

PIP2 : phosphatidylinositol 4,5- biphosphate, PLC : phospholipases C, DAG : diacylglycérol, PA : acide phosphatidique, DGKε : diacylglycérol kinase-ε, CDP-DAG : cytidine diphosphate-diacylglycérol, CDP-DAG synthase : cytidine diphosphate-diacylglycérol synthase, PI synthase : phosphatidylinositol synthase, PI : phosphatidylinositol, PI4K : phosphatidylinositol 4-kinase, PI4P : phosphatidylinositol-4-phosphate, PI4P5K : phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase, ATP : adénosine triphosphate, ADP : adénosine diphosphate, CTP : cytidine triphosphate, PPi : groupement pyrophosphate, CMP : cytidine monophosphate (Epand, 2017).

B. Les phospholipases C dans la sécrétion chlorure

Il existe dans la littérature des preuves de l'existence d'une intervention des phospholipases C dans la sécrétion chlorure en chambre de Ussing. Dans cette dernière partie nous aborderons les études qui vont dans le sens d'une activation de la sécrétion chlorure par les phospholipases C dans plusieurs modèles cellulaires qui expriment le canal CFTR.

Le peroxyde d'hydrogène stimule la sécrétion chlorure dépendante de CFTR via sa fixation au niveau des récepteurs EP₄ couplés aux protéine Gαs (Conner et al., 2013) et il a été observé que la sécrétion chlorure dépendante de CFTR activée par l'H₂O₂ dans les cellules épithéliales bronchiques humaines diminue de 80 % en présence de l'inhibiteur pharmacologique des PLC : le composé U73122 (Ivonnet et al., 2015). Cette sécrétion chlorure est également dépendante i) du calcium intracellulaire puisque le chélateur calcique BAPTA-AM ainsi que l'inhibiteur des récepteurs à l'IP₃, le 2-APB, diminuent respectivement de 75 % et 80 % la réponse au peroxyde d'hydrogène et ii) de la protéine Epac.

Les acides désoxycholiques et chénodésoxycholiques stimulent également la sécrétion chlorure dépendante de CFTR en augmentant la concentration d'AMPC intracellulaire (Ao et al., 2013) et il a également été mis en évidence que la sécrétion chlorure par ces deux acides biliaires diminue de 60 %

le courant chlorure CFTR-dépendant lorsque les PLC sont inhibées dans les cellules épithéliales coloniques T84 (Domingue et al., 2016). La même équipe a par ailleurs montré que la stimulation par les acides biliaires est également réduite par le BAPTA-AM ainsi que par l'inhibition de la protéine Epac et le 2-APB mais elle n'est cependant pas affectée par l'inhibition des PKC. Ces résultats suggèrent l'implication du Ca^{2+} intracellulaire dans l'activation de la sécrétion chlorure par les PLC au cours d'une stimulation par les acides biliaires. Une autre équipe a montré que la sécrétion chlorure, induite cette fois-ci par une stimulation forskoline, dans ces mêmes cellules intestinales diminue de 40 % en présence de l'inhibiteur de PLC (Hoque et al., 2010). Il s'est avéré que cette sécrétion chlorure stimulée par la forskoline est par ailleurs également dépendante du Ca^{2+} intracellulaire et des PKC.

Dans des cellules épithéliales intestinales canines (SCBN), il a été montré que la sécrétion chlorure qui suit une activation des récepteurs PAR_2 (en anglais « protease-activated receptor 2 ») est diminuée de 60 % en présence de l'inhibiteur des PLC (van der Merwe et al., 2009). Par ailleurs les auteurs ont montré que cette sécrétion chlorure, qui implique les PLC, passe aussi par l'activation des $\text{PKC}\beta_1$, $\text{PKC}\delta$ et $\text{PKC}\epsilon$.

La sécrétion chlorure dépendante de CFTR qui résulte de la stimulation des récepteurs P2Y par l'UTP dans les cellules épithéliales bronchiques humaines est également diminuée d'environ 60 % en présence de l'inhibiteur des PLC (Namkung et al., 2010). D'autre part, il a été montré que cette sécrétion chlorure activée par l'UTP est dépendante du calcium intracellulaire mais indépendante des PKC.

En résumé, en fonction de la stimulation et du modèle utilisés, la sécrétion chlorure dépendante des PLC passe soit par la voie calcique, soit par l'activation des PKC, soit par l'activation des deux à la fois. A partir de ces exemples publiés dans la littérature nous comprenons maintenant que les PLC, via l'activation des PKC et l'augmentation calcique intracellulaire, ont une action sur la sécrétion chlorure, et à fortiori sur le canal CFTR.

Problématique et objectifs

Notre objectif au cours de ces trois années de thèse était double et nous avons scindé le projet en deux parties. La première a consisté à approfondir le rôle des phospholipases C dans la sécrétion chlorure dépendante de CFTR, tandis que la deuxième partie a reposé sur l'étude de la régulation de l'influx calcique par les phospholipases C. Ces deux parties du projet ont été menées en parallèle dans les cellules épithéliales bronchiques qui expriment la protéine CFTR wild type ou CFTR-F508del.

I. Exploration du rôle des PLC dans la sécrétion chlorure dépendante de CFTR

La protéine CFTR est régulée par de multiples acteurs cellulaires tels que la PKA, les PKC, les adénylates cyclases ou encore le Ca^{2+} , pour n'en citer que quelques-uns. Il s'agit en effet d'une protéine qui est connectée à de nombreux canaux et constituants cellulaires : aujourd'hui il est recensé pas moins de 616 protéines qui établissent des interactions physiques et/ou fonctionnelles avec le canal CFTR (<https://www.ebi.ac.uk/intact/>). La régulation du canal CFTR est encore activement étudiée dans un souci d'augmenter la spécificité et l'activité de la pharmacologie existante. Notre recherche se place, à ce titre, dans la découverte de nouveaux acteurs cellulaires endogènes qui régulent le canal CFTR. Quelques études ont montré que les phospholipases C contrôlent la sécrétion chlorure dans des cellules qui expriment la protéine CFTR (Conner et al., 2013; Domingue et al., 2016; Hoque et al., 2010; Namkung et al., 2010), cependant aucune isoforme spécifique n'a pour l'instant été mise en cause dans cette régulation.

Le premier objectif était de vérifier l'implication des phospholipases C dans la sécrétion chlorure dépendante de CFTR suite à une stimulation forskoline dans les lignées épithéliales bronchiques humaines qui expriment soit le CFTR-WT, soit le CFTR-F508del corrigé par la température. Nous avons ensuite regardé plus concrètement la participation dans la sécrétion chlorure, activée par la forskoline ou l'UTP, de trois isoformes de PLC exprimées dans les cellules épithéliales bronchiques : la PLC δ 1, la PLC γ 1 et la PLC β 3 (Bezzerra et al., 2011; Vachel et al., 2015; Xu et al., 2013). L'enjeu de cette investigation était de caractériser les isoformes de PLC qui participent à la régulation endogène de la sécrétion dépendante à la fois de la protéine CFTR-WT et de la protéine CFTR-F508del corrigée par la température, dans l'intention d'améliorer la conductance dépendante de CFTR par la voie des phospholipases C dans le contexte de la mucoviscidose.

II. Étude de la régulation de l'influx calcique par les phospholipases C

Les dysfonctionnements ioniques dans la mucoviscidose ne sont pas uniquement le fait du défaut de sécrétion chlorure de CFTR. Même si la mutation du canal constitue l'origine de la maladie, plusieurs

canaux, autres que CFTR, subissent des défauts de régulation en présence de la mutation CFTR-F508del : c'est le cas du canal calcique TRPV6. Ce dernier est régulé par de multiples acteurs, dont la β -glucuronidase Klotho (Lu et al., 2008; Takumida et al., 2009), les protéines annexine 2 et S100A10 (van de Graaf et al., 2003), et la PLC δ 1 (Thyagarajan et al., 2008, 2009; Vachel et al., 2015). Parmi les phospholipases C, seule la PLC δ 1 a été pour l'instant mise en cause dans la régulation de TRPV6. Dans les cellules épithéliales bronchiques qui expriment la protéine CFTR-WT, il a bien été confirmé que cette phospholipase régule négativement le canal TRPV6 (Vachel et al., 2015). En revanche dans les cellules épithéliales bronchiques qui expriment la protéine CFTR-F508del, cette régulation n'a pas encore été explorée.

Notre deuxième objectif au cours de ce projet de thèse était donc de comprendre la régulation du canal TRPV6 par la PLC δ 1 dans les cellules épithéliales bronchiques qui expriment la mutation CFTR-F508del. Par ailleurs le concours de la PLC γ 1 et de la PLC β 3 dans la régulation de cet influx dépendant de TRPV6 n'a jamais été exploré : nous l'avons donc étudié dans les cellules épithéliales bronchiques qui expriment soit la protéine CFTR-WT, soit la protéine CFTR-F508del.

Matériel et méthodes

I. Culture cellulaire

Les expériences de ce projet de thèse ont été menées dans des lignées cellulaires bronchiques humaines immortalisées et sélectionnées pour l'étude du CFTR par l'équipe du Professeur Gruenert (Cozens et al., 1994).

A. Lignées 16HBE14o- et CFBE41o-

Les cellules 16HBE14o- sont des cellules épithéliales pulmonaires issues d'un patient sain vis-à-vis de la mucoviscidose et qui expriment la protéine CFTR-WT, tandis que les cellules CFBE41o- sont des cellules épithéliales pulmonaires qui proviennent d'un patient atteint de mucoviscidose et homozygote pour la mutation F508del-CFTR. Ces deux lignées ont été offertes au laboratoire par l'équipe du Professeur Claude Ferec et présentent l'avantage d'exprimer le canal CFTR de manière endogène, permettant d'éviter les éventuels biais liés à la surexpression.

1. Milieux de culture

Les lignées 16HBE14o- et CFBE41o- sont cultivées dans du milieu EMEM (BE12-662F, Lonza) complémenté par 10 % de SVF, 1,8 mM de L-glutamine et 0,05 mg/mL de plasmocine (InvivoGen) afin d'éviter la contamination par des bactéries et des mycoplasmes.

2. Entretien des lignées

Les lignées sont entretenues en flasque T75 cm² (3290, Cellbind®, Corning) à la densité de 2.10⁵ cellules. Lorsque les cellules atteignent 80 % de confluence, elles sont rincées une fois au PBS sans Ca²⁺/Mg²⁺. Un volume de 2 mL de trypsine (T4049, sigma) chauffée à 37°C est ensuite déposé dans la Flask. Celle-ci est placée 5-10 minutes à 37°C dans l'incubateur jusqu'au décollement des cellules qui peut être observé au microscope. La trypsine qui contient les cellules est ensuite prélevée et déposée dans un tube falcon contenant 18 mL de milieu de culture, de façon à neutraliser la trypsine. Le falcon est centrifugé 5 min à 1000 rpm, le surnageant est aspiré et le culot est repris dans 3 mL de milieu de culture EMEM supplémenté avec de la plasmocine. Les cellules sont dénombrées sur cellule de Malassez, puisensemencées dans des boites ou inserts semi-perméables.

B. Lignées CFBE-WT et CFBE-ΔF508

L'expression de la protéine CFTR est faible dans la lignée CFBE41o- et certaines mesures, comme celles du courant de court-circuit dépendant du CFTR, nécessitent l'utilisation de modèles qui sur-expriment la protéine F508del-CFTR pour enregistrer un signal. Afin d'étudier la fonction du canal CFTR muté à la surface apicale, il est nécessaire de corriger le défaut d'adressage de la protéine CFTR-F508del. Une telle correction peut être obtenue par des moyens pharmacologiques tels que le VX 809. D'un point de vue expérimental, il est également possible de stimuler l'adressage de la protéine mutée en abaissant la température à 27-29°C (Denning et al., 1992). C'est ce type de correction à 27°C qui a été utilisé au cours de nos expériences. Nous avons ainsi eu recours à la lignée CFBE-F508del qui correspond à la lignée CFBE41o- dans laquelle a été transfecté stablement un plasmide codant pour la protéine CFTR-F508del, et à la lignée CFBE-WT qui correspond à la lignée CFBE41o- dans laquelle a été transfecté stablement un plasmide codant pour la protéine CFTR-WT. L'entretien de ces lignées est le même que pour les lignées 16HBE14o- et CFBE41o-, seuls les milieux de culture diffèrent.

1. Milieux de culture

Les lignées de sur-expression CFBE-WT et CFBE-F508del sont cultivées dans du milieu MEM (10370-047, Gibco) complété par 10 % de SVF, 1,8 mM de L-glutamine, 1% de pénicilline/streptomycine (P0781, Sigma) et 0,005 mg/mL de puromycine (A1138-03, Gibco) qui correspond à l'antibiotique de sélection des deux plasmides.

2. Congélation et décongélation des lignées

Un stock des différentes lignées peut être constitué en congelant des cellules dans de l'azote liquide. Pour cela les cellules sont décollées de leur flasque selon le protocole habituellement utilisé pour l'entretien des lignées, puis sont reprises dans un volume contenant 90 % de serum et 10% de DMSO (agent cryoprotecteur utilisé pour obtenir une congélation optimale des cellules), puis déposées dans des tubes qui sont placés à -80°C pendant 24 heures avant d'être stockés dans l'azote liquide.

Pour la décongélation des cellules, les tubes sont placés au bain marie à 37°C jusqu'au décollement du culot cellulaire. Celui-ci est dispersé dans 35mL de milieu de culture puis centrifugé 5 minutes à 1000 rpm de façon à éliminer le DMSO. Le surnageant est ensuite aspiré et le culot cellulaire est repris dans 6 mL de milieu de culture pour être disposé en flasque T25 cm².

C. Cellules humaines épithéliales respiratoires bronchiques (hAECB)

Certaines des expériences menées sur lignées ont été vérifiées sur des cellules humaines épithéliales bronchiques primaires (hAECB) fournies par la société épithelix® (Genève, Suisse) au passage 1. Nous avons utilisé un lot de cellules provenant d'un patient sain vis-à-vis de la mucoviscidose et un lot de cellules provenant d'un patient porteur de la mutation F508del-CFTR pour réaliser des comparaisons. Les cellules hAECB comprennent des cellules ciliées, des cellules à mucus et des cellules basales qui peuvent être cultivées en conditions air-liquide, pour obtenir un pseudo-épithélium de cellules différenciées. Les essais de culture en air-liquide se sont révélés peu concluants, les expériences réalisées avec les cellules hAECB ont donc été menées uniquement sur des cultures en 2 dimensions.

1. Milieux de culture

Les cellules hAECB sont cultivées dans du milieu hAEC culture medium (EP09AM, epithelix) qui contient des antibiotiques (Pénicilline 100U/mL et streptomycine 100µg/mL). Ces cellules sont fournies au passage 1 et peuvent être entretenues en flasque T75 cm² (NC-156499, Nunc) jusqu'au passage 7. Du milieu DMEM + Glucose GlutaMaxb (31966021, Gibco) complémenté avec 10% de FBS (16250, Gibco) est utilisé pour neutraliser la trypsine lors des repiquages.

2. Caractéristiques des deux patients

Le sujet sain et le patient atteint de mucoviscidose dont sont issues les cellules hAECB non CF et CF ne possèdent pas les mêmes caractéristiques, au-delà de la présence de la protéine CFTR mutée. Il est nécessaire d'en tenir compte au cours de l'analyse des résultats de façon à écraser les éventuels biais statistiques.

	Patient non CF	Patient CF
Numéro de lot	02AB067101	CFAB045202
Age	72 ans	32 ans
Sexe	Homme	Homme
Origine	Caucasien	NC
Fumeur	Non	Non
Mutation	/	ΔF508 homozygote
Date de congélation	Janvier 2015	Avril 2013

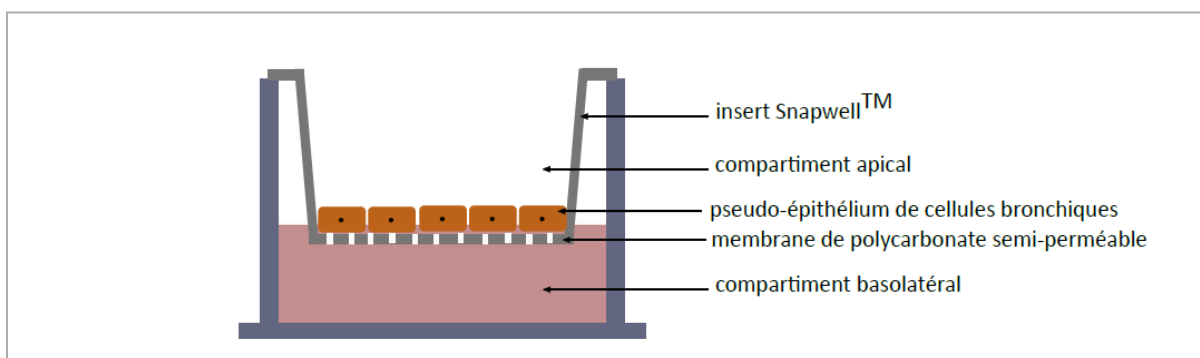
Tableau 1 : Informations concernant les deux donneurs de cellules hAECB primaires

3. Entretien

Lorsque les cellules atteignent 80% de confluence, elles sont rincées trois fois au PBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, puis un volume de 4 mL de trypsine (15090, Gibco) diluée à 0,05% est déposé dans la flasque. Cette dernière est placée 10 minutes à 37°C dans l'incubateur jusqu'au décollement des cellules. Les cellules sont ensuite reprises dans 35 mL de DMEM et centrifugées 5 minutes à 1000 rpm. Une fois le surnageant aspiré, les cellules sont reprises dans du milieu hAEC culture medium et ensemencées en flasque T75 cm² dans un volume final de 30mL et la flasque est maintenue à 37°C dans l'incubateur.

D. Culture de cellules polarisées

Les lignées précédemment décrites sont cultivées sur des filtres semi-perméables (3407, Corning) de façon à obtenir un tapis cellulaire polarisé différencié se comportant comme un pseudo-épithélium. L'objectif est de se rapprocher des conditions physiologiques que l'on retrouve dans l'organisme au niveau du poumon. Deux protocoles différents ont été utilisés : un protocole de culture air/liquide (ALI) (**Figure 21**) généralement utilisé dans les laboratoires pour les expériences de fonctionnalité du CFTR en chambre de Ussing et un protocole de culture liquide/liquide (LI) pour les techniques d'immunomarquage et de proximity ligation assay puisqu'il a été montré que la différenciation des cellules épithéliales pulmonaires était plus efficace sur les pseudo-épithéliums cultivés en liquide/liquide, en regard au marquage des jonctions cellulaires (ZO-1, occludine et



claudine-1) (Ehrhardt et al., 2006).

Figure 21 : Représentation de l'interface air-liquide utilisée pour cultiver les cellules épithéliales pulmonaires bronchiques

1. Culture Air/Liquide (ALI)

La culture ALI est utilisée pour les expériences de fonctionnalité en chambre de Ussing (**Figure 21**). Les plaques d'inserts sont couvertes avec 200µL/puits de fibronectine (F0895, Sigma) et déposées

minimum 20 minutes à 37°C dans l'incubateur. Les puits sont ensuite rincés avec 0,5 mL de PBS et ensemencés à la densité de 5.10^5 cellules/puits pour un volume final de 500 μ L de milieu avec plasmocine. Les plaques d'inserts sont ensuite déposées 5 minutes à l'incubateur, le temps que les cellules se déposent sur le filtre, puis 2 mL de milieu de culture sans plasmocine sont ajoutés au niveau basolatéral dans chaque insert. Au bout de 2 jours le milieu apical est aspiré pour permettre le développement de la culture en air/liquide. Le milieu basal est changé tous les deux jours et les cellules sont cultivées pendant 7 à 10 jours avant d'être utilisées.

2. Culture Liquide/Liquide (LI)

La culture LI est employée pour les expériences d'immunomarquage et de proximity ligation assay. Les inserts sont recouverts de fibronectine suivant le même protocole que pour la culture ALI, puis les cellules sont ensemencées à la densité de 2.10^5 cellules/puits pour un volume final de 500 μ L de milieu avec plasmocine. La densité de cellules à ensemercer est plus faible que pour la culture ALI car les cellules prolifèrent plus rapidement. La plaque est ensuite déposée 5 minutes à l'incubateur le temps que les cellules se déposent sur le filtre, puis 2 mL de milieu de culture sans plasmocine sont ajoutés au niveau basolatéral dans chaque insert. Les cellules sont cultivées ainsi pendant 8 à 10 jours et le milieu apical (avec plasmocine), comme le milieu basal (sans plasmocine), sont changés tous les 2 jours.

II. Techniques de biologie cellulaire et de biochimie

A. Western blot

1. Principe

La technique de western blot permet de détecter la présence de protéines d'intérêt au sein d'un échantillon biologique en séparant l'ensemble des protéines contenues dans l'échantillon sur un gel puis en marquant les protéines d'intérêt par l'intermédiaire d'anticorps spécifiques. C'est après l'invention par Edwin Southern, dans les années 1970, du southern blot (détection de séquences d'ADN spécifiques) (Southern, 2015) et du northern blot (détection de séquences d'ARN spécifiques) que Harry Towbin et ses collègues optimisent le western blot dans les années 1980 (Towbin, 2015) (Towbin et al., 1979). C'est une technique semi-quantitative, très largement répandue dans les laboratoires de recherche et de diagnostic, qui permet de mesurer la quantité des protéines d'intérêt contenues dans l'échantillon en la rapportant à la quantité d'une protéine de référence qui est connue.

2. Lyse cellulaire et dosage des protéines

Pour les expériences de Western blot, les cellules ont été cultivées i) sur boîtes de 6 mL jusqu'à 80% de confluence ou ii) sur inserts en interface air-liquide. Les échantillons sont rincés 2 fois avec du PBS froid puis les cellules sont lysées avec i) 100 µL de tampon de lyse par boîte (**Tableau 2**) ou ii) 50 µL de tampon de lyse par puits. Un grattoir est utilisé pour récupérer l'ensemble des cellules qui ont adhéré, puis les cellules sont récupérées dans un tube eppendorf de 1.5 mL.

Tampon de lyse	Tampon de lyse CFTR
Nonidet P-40 : 0,5% (v/v)	Nonidet P-40 : 1% (v/v)
NaCl : 150 mM	Tris HCl : 10 mM
NaF : 10 mM	DOC : 0,5% (m/v)
Na ₃ VO ₄ : 1 mM	Pefabloc SC : 1mM
Tris HCl : 50 mM	pH : 7,5
Pefabloc SC : 1 mM	
pH : 7,6	

Tableau 2 : Composition des tampons de lyse

Le tube est vortexé et déposé sur la glace pendant 30 minutes. Il est ensuite centrifugé à 4°C pendant 5 min à 14 000 rpm puis le surnageant qui contient les fractions protéiques est récupéré et placé dans un nouveau tube. Le dosage des protéines se fait ensuite en utilisant la méthode BCA (Bicinchoninic acid Assay). Dans un tube eppendorf sont mélangés 47 µL d'eau, 3 µL de lysat protéique, 990 µL d'acide bicinchoninique (B9643, Sigma) et 20 µL de sulfate de cuivre (102784, Merck). Certains acides aminés comme la cystéine, la cystine, le tryptophane et la tyrosine, vont alors réduire le Cu²⁺ en Cu¹⁺. L'acide bicinchoninique, en conditions alcalines, forme alors un complexe violet en se fixant sur le Cu¹⁺. Ainsi, plus la solution est foncée, plus la quantité de protéines présentes dans la solution est importante. La quantité de protéines peut ensuite être mesurée, à l'aide d'une gamme étalon de concentration de protéine connue (la BSA dans notre cas), et un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 562 nm.

3. Gel d'électrophorèse et transfert sur membrane de nitrocellulose

Les western blots sont réalisés en utilisant un système de cassettes jetables (Novex® NC2010, life technologies) dans lesquelles sont coulés les gels à la concentration de 10-12% d'acrylamide (**Tableau 3**, **Tableau 4** et **Tableau 5**). La concentration est ajustée avec du tampon de lyse de façon à obtenir 50 µg de protéine par puits avant dépôt sur le gel, puis du Laemmli 5X (ID 1624, DGElectrosystem Inc) est ajouté et les protéines sont dénaturées pendant 5 minutes à 95 °C au bain sec. Les cassettes sont

déposées dans les cuves d'électrophorèse (XCell SureLock™, Thermo-Fischer) avec du tampon d'électrophorèse (**Tableau 6**) puis les échantillons ainsi que le marqueur de taille de protéines colorées (RPN800E, GE Healthcare) sont déposés sur les gels.

Tampon Lower 4x	Tampon Upper 4x
Tris : 18.07 g	Tris : 6.06 g
SDS 10 % (m/v): 4 mL	SDS 10 % (m/v): 4 mL
Qsp H ₂ O : 100 mL	Qsp H ₂ O : 100 mL
pH : 8,8	pH : 6,8

Tableau 3 : Composition des tampons lower et upper 4x pour la réalisation des gels d'acrylamide

	Gel de séparation 10%	Gel de séparation 12%	Gel de concentration
H ₂ O	3 mL	2,7 mL	2,6 mL
Tampon lower 4x	1,5 mL	1,5 mL	/
Tampon Upper 4x	/	/	1 mL
Acrylamide	1,5 mL	1,8 mL	0,4 mL
Temed	6 µL	6 µL	4 µL
APS 10%	60 µL	60 µL	40 µL

Tableau 4 : Composition des gels d'acrylamide

	Gel de séparation 6%	Gel de concentration
H ₂ O	2,4 mL	1,26 mL
Tampon lower 4x	1 mL	/
Tampon Upper 4x	/	0,5 mL
Acrylamide	0,6 mL	0,24 mL
Temed	4 µL	2 µL
APS 10%	40 µL	20 µL

Tableau 5 : Composition des gels d'acrylamide pour la protéine CFTR

Tampon d'électrophorèse

900 mL H₂O
100 mL TG-SDS 10x (UP91495E, Interchim)

Tableau 6 : Composition du tampon d'électrophorèse

La migration est lancée en appliquant les paramètres suivants : 80 mA, 200V pendant 1h45. Une fois la migration terminée, le gel est récupéré en brisant la cassette, puis déposé dans le « sandwich » composé, dans l'ordre, de : 2 éponges - papier Wattman - gel - membrane de nitrocellulose - papier Wattman - 2 éponges comme représenté dans la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** Le sandwich est monté dans la cassette de transfert (XCell II™ Blot module, Thermo-Fischer) dans laquelle on ajoute environ 100 mL de tampon de transfert (**Tableau 7**), puis de l'eau froide est disposée dans la cuve d'électrophorèse pour refroidir le système au cours du transfert et le générateur est programmé selon les paramètres suivants : 80 V, 200 mA pendant 1H30.

TG-SDS 10x Tris base : 15,15 g Glycine : 75 g Qsp H ₂ O : 500 mL	
Tampon de transfert 750 mL H ₂ O 200 mL ethanol 96% 50 mL TG-SDS 10x	Tampon de transfert CFTR 700 mL H ₂ O 200 mL ethanol 96% 10 mL TG-SDS 10x

Tableau 7 : Composition des tampons de transfert

Au laboratoire, les western blots pour la détection de la protéine CFTR sont traditionnellement réalisés avec un tampon de lyse plus doux, équivalent à celui utilisé pour des expériences d'immuno-précipitation, et le système d'électrophorèse utilisé est différent. Les gels de séparation sont coulés à 6% (**Tableau 5**) dans un système de plaques en verres (Multiple gel Caster, Hoefer Inc). Après dépôt des échantillons sur le gel, la migration est lancée dans la cuve d'électrophorèse (SE250, Hoefer Inc) selon les paramètres suivants : 30 mA, 270V pendant 45 minutes. Le transfert se déroule comme précédemment décrit avec le système Mini Trans-Blot® Cell de Bio-rad selon les paramétrages suivants : 200 mA, 80V pendant 1h.

4. Dépôt des Anticorps et révélation

La membrane qui contient maintenant les protéines à révéler est lavée 5 min dans une solution de PBS-tween 0,1% pendant 5 min à 4°C sous agitation. Puis elle est mise à saturer dans une solution de PBS-tween 0,1% qui contient du lait écrémé (0.5 g/mL) pendant 2h à 4°C sous agitation. La membrane est ensuite rincée 3 fois avec du PBS-tween 0,1% et lavée 3 fois 5 minutes à 4°C sous agitation avec cette même solution pour éliminer le lait de façon efficace. Cette étape permet de mieux conserver les anticorps primaires en vue d'une utilisation ultérieure. Les anticorps primaires (**Tableau 8**) sont ensuite dilués dans la solution de PBS-tween 0,1% et déposés sur la membrane toute la nuit, à 4°C, sous agitation. Le lendemain la membrane est rincée et lavée 3 fois avec la solution de PBS-tween 0,1%, puis les anticorps secondaires dilués au 1/10 000 dans du PBS-tween qui contient du lait sont déposés sur la membrane 1h sous agitation à 4°C.

Anticorps	Référence	Dilutions	
		Western blot	Immuno-marquage
Mouse anti-PLC δ 1 monoclonal	sc-393464, Sancta cruz biotechnology	1/200	1/100
Goat anti-PLC δ 1 polyclonal	sc-7521, Santa cruz biotechnology	/	1/100
Mouse anti-PLC γ 1 monoclonal	sc-7290, Sancta cruz biotechnology	1/200	/
Mouse anti-PLC β 3 monoclonal	sc-133231, Sancta cruz biotechnology	1/200	1/200
Rabbit anti-PLC β 3 polyclonal	PA5-83454, ThermoFischer	/	1/200
Rabbit anti-actine polyclonal	A2066, Sigma	1/5000	/
Mouse anti-CFTR monoclonal	MAB 3480, Merck	1/1000	/
Mouse anti-CFTR monoclonal	MAB 25031, R&D Systems	/	1/ 100
Rabbit anti-Annexin A2 polyclonal	PA5-14318, ThermoFischer	/	1/100
Mouse anti-Annexin A2 monoclonal	sc-47696, Santa cruz biotechnology	1/1000	1/100
Rabbit anti-S100A10 polyclonal	11250-AP, Proteintech®	/	1/100
Mouse anti-S100A10 monoclonal	sc-81153, Santa cruz biotechnology	1/1000	/
Rabbit anti TRPV6 polyclonal	ACC-036, Alomone	/	1/100
Goat anti TRPV6 polyclonal	Sc-28396, Santa cruz biotechnology	/	1/100
Mouse anti-NaK-ATPase monoclonal	Sc-21712, Santa cruz biotechnology	1/1000	/

Tableau 8 : Anticorps primaires utilisés en western blot et immunomarquage

B. Transfection de siRNA (small interfering RNA)

1. Principe

Le principe de la technique, initié à la fin des années 1990 (Fire et al., 1998), est de diminuer l'expression de protéines par blocage de leurs ARNm. La synthèse des protéines fait en effet intervenir une étape de transcription de l'ADN en ARNm, puis une étape de traduction de l'ARNm en protéines. La technique intervient à ce dernier niveau : un petit ARN interférant (siRNA), façonné pour cibler un ARNm spécifique, va se fixer sur cet l'ARNm et ainsi empêcher sa traduction. Le siRNA, introduit dans la cellule par transfection, est alors pris en charge par le complexe enzymatique RISC (RNA-induced silencing complex) qui va séparer les deux brins du siRNA. Le brin complémentaire va se fixer à l'ARNm cible ce qui va se traduire par la destruction de l'ARNm ciblé (Nambudiri and Widlund, 2013).

2. Protocole

i. Transfection des cellules épithéliales polarisées

La transfection de siRNA sur cellules épithéliales polarisées est délicate car l'établissement de jonctions serrées ainsi que la formation de plusieurs couches cellulaires rendent la transfection très difficile. Ainsi la transfection des telles cellules ne peut être réalisée comme habituellement, c'est-à-dire 2 à 3 jours seulement avant l'expérimentation, mais s'effectue le jour de l'ensemencement, comme il est recommandé pour optimiser la transfection de cellules épithéliales polarisées (Ramachandran et al., 2013). L'agent de transfection utilisé, l'INTERFERin® (409-10, polyplus-transfection), a été choisi car il possède une grande efficacité de transfection, il nécessite de faibles volumes de siRNA et il est utilisable avec le sérum et les antibiotiques. Le protocole utilisé pour la transfection des cellules épithéliale

100µL de milieu de culture sans sérum et x µL de siRNA (**Tableau 9**) sont disposés dans un tube eppendorf. 4 µL d'INTERFERin® sont ensuite ajoutés et le tube est vigoureusement mélangé au vortex pendant 10 secondes. La totalité de la solution est ensuite déposée sur l'insert préalablement recouverte de fibronectine. Toute la plaque d'inserts est traitée ainsi puis est mise à incuber entre 10 et 30 min sous la hotte pour permettre la formation des complexe siRNA/INTERFERin®. Les cellules, reprises dans du milieu normal avec sérum et antibiotiques, sont ensuite déposées à la concentration de 500 000 cellules/puits pour un volume final de 600 µL et la plaque est mélangée doucement. Du milieu de culture est ajouté dans le compartiment basolatéral et la plaque est déposée dans l'incubateur à 37°C. La plaque est ainsi laissée dans l'incubateur deux jours, puis le milieu apical est aspiré et le milieu basolatéral changé tous les deux jours jusqu'à la réalisation de l'expérimentation.

SiRNA	Référence	Concentration	Volume pour 100 μ L de milieu sans sérum
siRNA PLC δ 1	sc-40841	20 nM	1,2 μ L
siRNA PLC γ 1	sc-29452	40 nM	2,4 μ L
siRNA PLC β 3	sc-36272	20 nM	1,2 μ L
siRNA controle	sc-37007	20 nM / 40 nM	1,2 μ L / 2,4 μ L

Tableau 9 : Concentration des siRNA utilisés pour la reverse transfection des cellules épithéliales polarisées

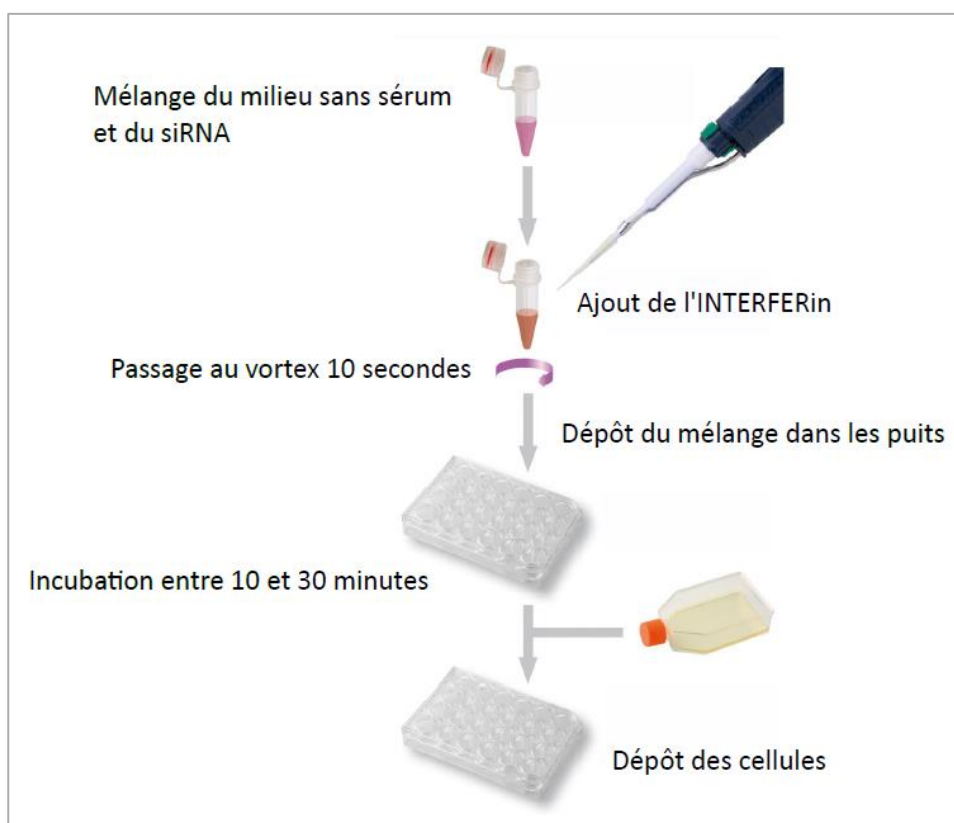


Figure 22 : Protocole schématisé de la reverse transfection de siRNA sur inserts

ii. Transfection de cellules épithéliales cultivées sur boîtes

Pour les cellules épithéliales cultivées sur boîtes, le protocole habituel de transfection est utilisé et les siRNA sont utilisés à la concentration de 6 nM, concentration à laquelle est obtenue une diminution efficace de l'expression protéique. La transfection est réalisée lorsque les cellules ensemencées sur boîtes arrivent à 30-50 % de confluence. 200 μ L de milieu de culture sans sérum et 1,32 μ L de siRNA

sont disposés dans un tube eppendorf. 8 μ L d'INTERFERin® sont ensuite ajoutés, le tube est vigoureusement mélangé au vortex pendant 10 secondes et laissé à incuber entre 10 et 30 min sous la hotte pour permettre la formation des complexes siRNA/INTERFERin®. Pendant ce temps, le milieu de culture des boîtes est changé par 2 mL de nouveau milieu avec sérum et antibiotique, puis le mélange siRNA/ INTERFERin® est déposé sur les cellules. Les boîtes sont mélangées doucement puis sont déposées dans l'incubateur. Les cellules sont utilisées 72h après la transfection.

III. Techniques de biologie et de physiologie cellulaire

A. Immunomarquage indirect

1. Principe

L'Immunomarquage indirect est une technique qui permet de visualiser des protéines au sein d'un échantillon grâce à des anticorps couplés à de la fluorescence. Les immunomarquages ont été réalisés sur des pseudo-épithéliums de cellules différenciées sur inserts après fixation et perméabilisation des cellules selon les recommandations de la technique (Donaldson, 2015). Cette technique, contrairement au western blot, permet la localisation des protéines dans l'espace. Néanmoins elle nécessite l'utilisation d'anticorps spécifiques, qui tiennent compte des structures tertiaires et quaternaires des protéines d'intérêt.

2. Protocole

Les cellules sont cultivées sur inserts pendant 8 à 11 jours en interface liquide/liquide. Les inserts sont rapidement rincés puis lavés 2 x 5 min au TBS sous agitation. Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldéhyde 3% pendant 20 minutes sous agitation. Après 3 nouveaux lavages de 5 minutes au TBS les cellules sont perméabilisées avec du triton 0.1% pendant 10 minutes sous agitation. Après 3 autres lavages de 5 minutes, une étape de saturation avec une solution de TBS-BSA 1% est réalisée pendant 1 heure sous agitation. Les anticorps primaires (**Tableau 8**), dilués dans une solution de TBS-BSA 1% à la concentration voulue, sont déposés sur la nuit à 4 °C et sous agitation. Le lendemain, après 3 lavages au TBS, les anticorps secondaires (**Tableau 10**) ainsi que le marqueur nucléaire TO-PRO™3 iodide (1/500, Thermo-Fischer), dilués dans la solution de saturation TBS-BSA 1%, sont déposés pendant une heure sous agitation. Après 3 lavages de 5 minutes au TBS, les inserts sont découpés de façon à garder uniquement le filtre qui est déposé sur lames en verre. Les filtres sont montés avec du Mowiol et lamelles de verre de 16 mm de diamètre. Les échantillons peuvent ensuite être observés au microscope confocal à fluorescence (FV1000, Olympus).

	Référence	Dilution
Chicken anti-mouse Alexa Fluor 488	A-21200, ThermoFischer	1/100
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488	A-11034, ThermoFischer	1/100
Donkey anti-goat Alexa Fluor 555	A-21432, ThermoFischer	1/200
Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 555	A-31572, ThermoFischer	1/200

Tableau 10 : Anticorps secondaires utilisés en immunomarquage

B. Duolink

1. Principe

Le duolink, ou proximity ligation assay (PLA), est une technique qui permet de révéler une proximité entre deux partenaires d'intérêts lorsqu'ils sont à une distance inférieure à 40 nm grâce à l'utilisation d'anticorps primaires couplée à l'utilisation de sondes d'oligonucléotide (**Figure 23**).

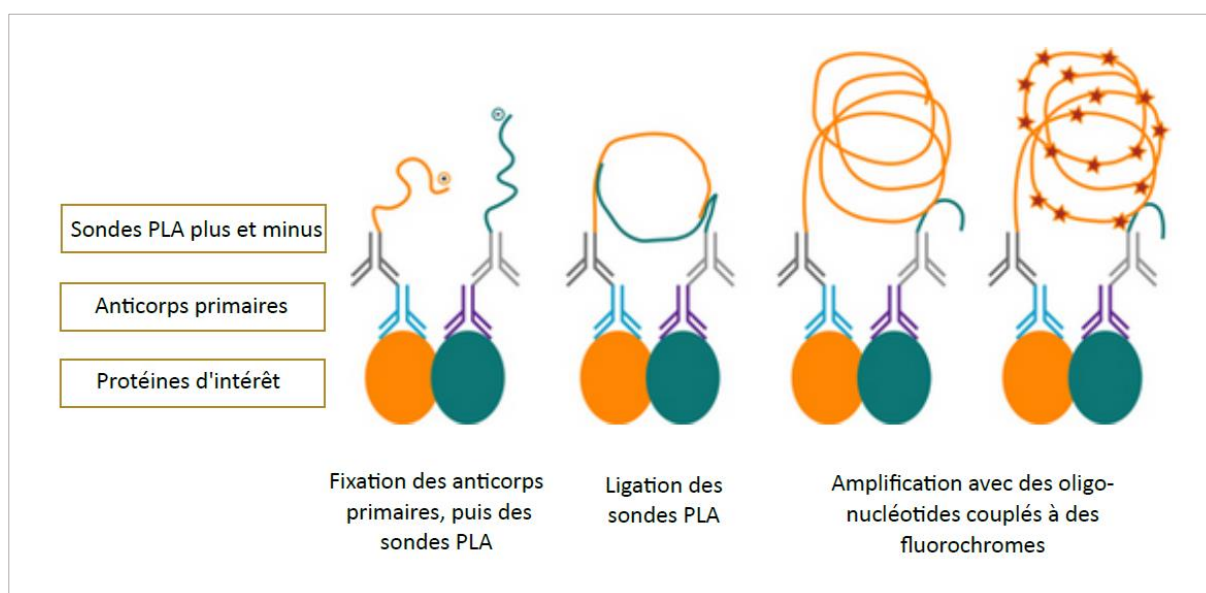


Figure 23 : Principe de la technique de proximity ligation assay

2. Protocole

La technique de PLA est utilisée pour étudier la proximité de deux protéines au sein de cellules épithéliales cultivées sur inserts pendant 7 à 10 jours. La première étape nécessite la fixation d'anticorps primaires sur une nuit selon le protocole d'immunomarquage indirect décrit

précédemment. Le lendemain les sondes PLA plus et minus (**Tableau 11**) sont diluées au 1/5^{ème} dans du tampon TBS-BSA 1% et laissées à température ambiante 20 minutes.

Sondes PLA	Référence
Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Mouse PLUS	DUO92001
Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Rabbit MINUS	DUO92005
Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Goat PLUS	DUO92003
Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Goat MINUS	DUO92006

Tableau 11 : Sondes PLA utilisées pour les expériences de duolink

Les cellules sont rincées 2 fois 5 min avec du TBS-BSA 1% puis les sondes PLA sont déposées sur les cellules (environ 100µL par puits) et la plaque est déposée dans l'incubateur à 37°C pendant 1 heure sous agitation. Les cellules sont ensuite rincées 2 fois 5 min avec la solution de lavage A (0,01M Tris, 0,15M NaCl, 0,05% tween 20). La solution de ligation est préparée au cours du dernier lavage en mélangeant la ligation sock au 1/5^{ème} et la ligase au 1/40^{ème} dans de l'eau milliQ. Ce mélange est déposé dans les puits et la plaque est mise à incuber 30 min à 37°C sous agitation. Les cellules sont ensuite rincées 2 fois 2 min avec la solution de lavage A. Pendant ce temps la solution d'amplification est préparée en mélangeant l'amplification stock au 1/5^{ème} et la polymérase au 1/80^{ème} dans de l'eau milliQ. À partir de cette étape le reste de l'expérience doit se dérouler à l'abri de la lumière. Ce dernier mélange est déposé dans les puits, la plaque est recouverte de papier aluminium puis placée dans l'incubateur à 37°C pendant 1h40 sous agitation. Les cellules sont ensuite rincées 2 fois 10 min avec la solution de lavage B (0,2M Tris, 0,1M NaCl). Les cellules sont rincées une dernière fois avec la solution B diluée au 0,01x. Les inserts avec les cellules sont découpés délicatement à l'aide d'un scalpel et sont montés entre lame et lamelle avec 10µL de milieu de montage qui contient du DAPI (DUO82040, Sigma Aldrich). Dans les jours qui suivent les échantillons sont observés au microscope confocal.

Pour chaque condition, 6 enregistrements réalisés sur l'épaisseur du pseudo-épithélium sont analysés à l'aide du logiciel imaris (Oxford Instruments) en prenant soin de soustraire le bruit de fond de chaque enregistrement. Pour la quantification, le nombre de spots rouges, représentant le signal d'amplification de deux sondes qui se sont hybridées, est rapporté au nombre total de noyau au sein de l'enregistrement.

C. Mesure du courant CFTR en chambre de Ussing

1. Principe

La chambre de Ussing a été imaginée par le zoologiste danois Hans Ussing dans les années 1950 pour mesurer le transport de sodium et de potassium à travers la peau de grenouille (Ussing and Zerahn, 1951). Le principe de la chambre de Ussing repose sur la propriété d'étanchéité de l'épithélium, ainsi que sur l'existence d'une asymétrie de distribution des protéines de transport. Il en résulte un flux d'ions et de solutés au travers du tissu. La technique de chambre de Ussing est utilisée pour étudier les transports ioniques au travers d'un épithélium d'un grand nombre de tissus ou de culture de cellules épithéliales. Pour notre étude, l'objectif est de mesurer le passage des ions Cl^- au travers du pseudo-épithélium de cellules pulmonaires humaines différenciées. Pour cela un gradient d'ions chlorure est appliqué entre le compartiment basolatéral et le compartiment apical, de façon à favoriser le passage des ions dans le sens d'une absorption du côté basolatéral et d'une sécrétion du côté apical.

2. Mise en place du système

Certains composés pharmacologiques, et particulièrement le VX-770, ont la propriété de rester coller sur les parois des cuves en plexiglas qui forment les chambres de Ussing. Pour éviter toute contamination des tracés, après chaque expérience réalisée, les cuves sont mises à tremper quelques heures dans une solution à 1,5 % (m/v) de phosphate (04277, Sigma Aldrich), puis nettoyées avec un goupillon. Elles sont ensuite rincées à l'eau puis trempées dans une solution d'HCl 0,1 % afin de neutraliser tous les résidus de phosphate. Enfin les cuves sont ensuite mises à tremper dans une bassine d'eau milliQ avant de pouvoir être utilisées.

Un insert vide de référence est disposé entre les chambres apicale et basale. Les électrodes, composées d'agar-KCl, sont insérées dans le dispositif : les électrodes de voltage, qui vont mesurer la ddp des cellules polarisées, sont placées au plus proche de l'insert et les électrodes de courant, qui vont injecter le courant nécessaire pour le maintien de la ddp fixe au cours de l'expérience, sont placées à côté des électrodes de voltage. 2 mL de milieu krebs apical et basal (**Tableau 12**) sont déposés dans chacune des cuves, le système de bullage (95% O_2 / 5% CO_2) est allumé et la référence est fixée à 0 mV.

Milieu Krebs Apical	Milieu Krebs Basal
NaCl : 1,2 mM	NaCl : 115 mM
Na gluconate : 115 mM	NaHCO ₃ : 25 mM
NaHCO ₃ : 25 mM	MgCl ₂ : 1,2 mM
MgCl ₂ : 1,2 mM	CaCl ₂ : 1,2 mM
CaCl ₂ : 4 mM	KH ₂ PO ₄ : 2,4 mM
KH ₂ PO ₄ : 2,4 mM	K ₂ HPO ₄ : 1,24 mM
K ₂ HPO ₄ : 1,24 mM	Glucose : 10 mM
Mannitol : 10mM	pH : 7,4 (NaOH)
pH : 7,4 (NaOH)	

Tableau 12 : Composition des milieux utilisés pour la chambre de Ussing

L'insert qui contient le pseudo-épithélium est ensuite disposé entre les deux chambres de plexiglas à la place de l'insert de référence, 4 mL des milieux krebs apical et basal sont disposés dans les cuves et le circuit est clampé à 0mV. Le courant de court-circuit, correspondant au courant qu'il est nécessaire d'injecter dans le circuit pour annuler la ddp, est mesuré par le voltmètre (VCC MC2, Physiologic Instruments), amplifié et visualisé en direct avec le logiciel « acquire and analysis » (Physiologic Instrument). Le courant de court-circuit, autrement appelé I_{sc} , est exprimé en $\mu A/cm^2$. Il représente le passage des ions à travers le pseudo-épithélium.

3. Protocoles utilisés

Toutes les substances pharmacologiques utilisées ont été disposées dans les cuves du côté apical, sauf indications contraires. Dans tous les protocoles, l'amiloride (100 μM) est ajouté au début de l'expérience pour bloquer le canal ENaC. Le CFTRinh172 (10 μM) puis l'UTP (100 μM) sont également ajoutés à la fin de l'expérience dans tous les protocoles pour attester de la spécificité de l'activation du CFTR ainsi que de la mobilisation calcique, respectivement.

Deux types de protocoles sont réalisés. Dans le protocole 1 le canal CFTR est d'abord activé par la forskoline (10 μM), puis les inhibiteurs sont ajoutés dans les cuves (**Figure 24 A**). Dans le protocole 2 l'ajout des inhibiteurs dans les cuves précède l'activation du CFTR (**Figure 24 B**). Ce dernier protocole est plus largement utilisé au cours de notre étude.

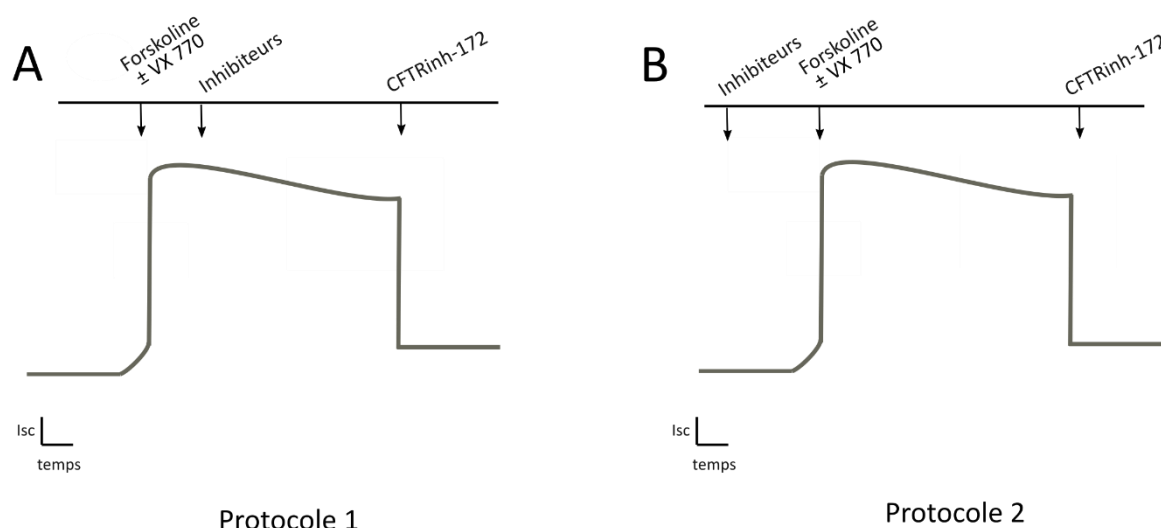


Figure 24 : Représentation des deux protocoles utilisés au cours des expériences en chambre de Ussing

4. Applications

L'épithélium rectal présente l'avantage d'exprimer la protéine CFTR en quantité importante et d'être accessible par rapport à l'épithélium pulmonaire. Ainsi la chambre de Ussing est utilisée pour mesurer le courant de court-circuit sur des biopsies rectales de patients comme moyen diagnostique pour la mucoviscidose (Mall et al., 2004) et également pour évaluer l'efficacité de nouveaux médicaments au cours des essais cliniques de phase II (Clancy et al., 2013).

L'utilisation de la technique s'étend au-delà du champ de la mucoviscidose puisqu'elle est utilisée pour mesurer la perméabilité apparente de molécules à travers l'épithélium intestinal. Il est par exemple possible de corrélérer la perméabilité de molécules au niveau du jéjunum humain à celle mesurée au niveau du jéjunum de rat en chambre de Ussing, pour prédire le passage de nutriments et de médicaments de l'intestin vers le sang (Lennernäs, 2007).

D. Mesure du Ca^{2+} intracellulaire

1. Principe

L'enregistrement des variations de Ca^{2+} intracellulaire peut se faire via l'utilisation de sondes calciques fluorescentes. Le Fluo-4-AM est un exemple de sonde calcique composée d'un chélateur calcique, d'un fluorophore pour permettre la visualisation des variations de Ca^{2+} et de groupements acetoxymethyl ester (AM) qui permettent le franchissement de la barrière cellulaire (**Figure 25**).

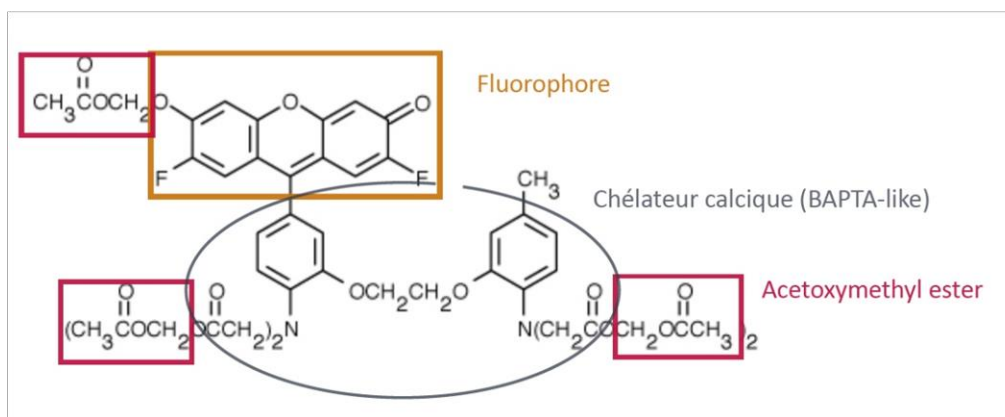


Figure 25 : Structure de la sonde Fluo-4-AM

Grace à l'ajout de groupements AM la sonde est suffisamment hydrophobe pour franchir les membranes cellulaires. À l'intérieur des cellules, les groupements AM sont estérifiés par les estérases cellulaires et le chélateur calcique se retrouve disponible pour lier le Ca^{2+} intracellulaire. L'excitation à 480 nm permet de révéler une émission de fluorescence qu'il est possible de suivre dans le temps et qui est le reflet de la concentration calcique intracellulaire.

2. Protocole

Les cellules sont cultivées dans des boîtes fond verre jusqu'à 80% de confluence. Les boîtes sont rincées deux fois avec une solution de Krebs 2,5 mM Ca^{2+} puis sont incubées pendant 25 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière dans une solution à 3 μM de Fluo-4-AM dilué dans du Krebs **Tableau 13**. Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec une solution de Krebs 2,5 mM Ca^{2+} ou 0 mM Ca^{2+} en fonction de l'expérience, puis la boîte est placée sur un microscope inversé (Zeiss). Les cellules chargées sont visualisables grâce à l'excitation à 488 nm, une première image (F_0) est prise sur un champ d'une vingtaine de cellules qui sont individuellement sélectionnées pour réaliser les enregistrements. Cette première image correspond à la fluorescence basale émise par les cellules et correspondant finalement à la concentration de Ca^{2+} basale avant toute stimulation. L'acquisition peut ensuite être démarrée : la zone sélectionnée est excitée à 488 nm et une image (F_x) est enregistrée toutes les 2 secondes durant 5 à 8 minutes. Chaque image F_x est comparée à l'image F_0 pour visualiser en temps réel la variation de fluorescence.

Milieu Krebs 2,5 mM Ca²⁺

NaCl : 118,4 mM

KCl : 4,7 mM

CaCl₂ : 2,5 mMKH₂PO₄ : 1,2 mMMgSO₄ : 1,2 mMNaHCO₃ : 2,5 mM

Glucose: 11,7 mM

Qsp H₂O

pH : 7,4 (NaOH)

330 mosmol (mannitol)

Milieu Krebs 0mM Ca²⁺

NaCl : 118,4 mM

KCl : 4,7 mM

KH₂PO₄ : 1,2 mMMgSO₄ : 1,2 mMNaHCO₃ : 2,5 mM

Glucose: 11,7 mM

Qsp H₂O

pH : 7,4 (NaOH)

330 mosmol (mannitol)

Tableau 13 : Composition des milieux utilisés pour la mesure de Ca²⁺ intracellulaire

Résultats

Les résultats sont présentés en trois parties. La première partie aborde le rôle des phospholipases C dans le courant chlorure CFTR-dépendant et a abouti à un article scientifique en préparation. Ces résultats sont exposés sous la forme d'un article scientifique alimenté de résultats complémentaires à l'étude et non publiés. La deuxième partie porte sur l'implication des phospholipases C dans l'influx calcique des cellules épithéliales bronchiques non CF et CF et la troisième partie traite plus concrètement du rôle de la PLC δ 1 et de ses partenaires dans la régulation de cet influx calcique. Les trois parties du projet ont été menées en parallèle dès le début de la thèse, puis nous avons décidé de nous concentrer plus particulièrement sur la première partie qui a donné des résultats intéressants pour la compréhension des constituants endogènes fondamentaux impliqués dans la sécrétion chlorure. Aussi nous voulons prévenir que les expériences montrées au sein de la deuxième et troisième partie correspondent à des résultats préliminaires pour l'étude des phospholipases C dans la régulation des canaux TRP dans les cellules épithéliales bronchiques.

PARTIE I : Implication des phospholipases C dans le courant chlorure dépendant du CFTR dans les cellules épithéliales bronchiques CFBE-WT et CFBE-F508del corrigées

A. Contexte

Parmi les acteurs cellulaires, bien connus à présent, qui participent à l'activité du canal CFTR nous retrouvons la PKA, la PKC et l'ATP (Billet et al., 2015; Dahan et al., 2001; Gadsby and Nairn, 1999; Jia et al., 1997; Seavilleklein et al., 2008). Un nombre croissant d'articles mettent aussi en avant le rôle du Ca^{2+} dans l'activation du canal CFTR (Billet and Hanrahan, 2013; Bozoky et al., 2017; Domingue et al., 2016; Ivonnet et al., 2015; Lérias et al., 2018). Les phospholipases C, en produisant, d'une part, de l' IP_3 qui augmente le Ca^{2+} intracellulaire et, d'autre part, du DAG qui permet d'activer les PKC, peuvent être considérées comme des activateurs du canal CFTR. Il a d'ailleurs été montré que les PLC jouaient un rôle dans le courant CFTR-dépendant suite à l'activation par le peroxyde d'hydrogène (Ivonnet et al., 2015), les acides désoxycholique et chénodésoxycholique (Domingue et al., 2016) et l'adénosine (Wang et al., 2008a). Nous avons voulu savoir dans quelle mesure les PLC participent, au cours d'une activation par la forskoline, au courant CFTR-WT et également, au court d'une stimulation forskoline + VX 770, au courant CFTR-F508del corrigé par la température, dans les lignées épithéliales bronchiques humaines.

B. Résumé de l'article

Par des expériences en chambre de Ussing sur des cellules cultivées sur inserts nous avons regardé l'effet de l'inhibition des PLC (inhibition pharmacologique ou interférence par ARN) en mesurant deux paramètres : i) le ΔI_{sc} CFTRinh-172 vingt minutes après l'activation du CFTR par de la forskoline (pour les cellules qui expriment la protéine CFTR-WT) ou par de la forskoline + du VX 770, un activateur du canal CFTR-F508del (pour les cellules qui expriment la protéine CFTR-F508del), et qui représente la portion de courant activée dépendante du canal CFTR (**Figure 26 A**) et ii) le ratio ΔI_{sc} CFTRinh-172/ ΔI_{sc} forskoline $\pm$ VX 770 qui rend compte du courant CFTR-dépendant encore activé au bout de 20 minutes par rapport à l'activation initiale et qui témoigne finalement de la perte du courant en fonction du temps (**Figure 26 B**).

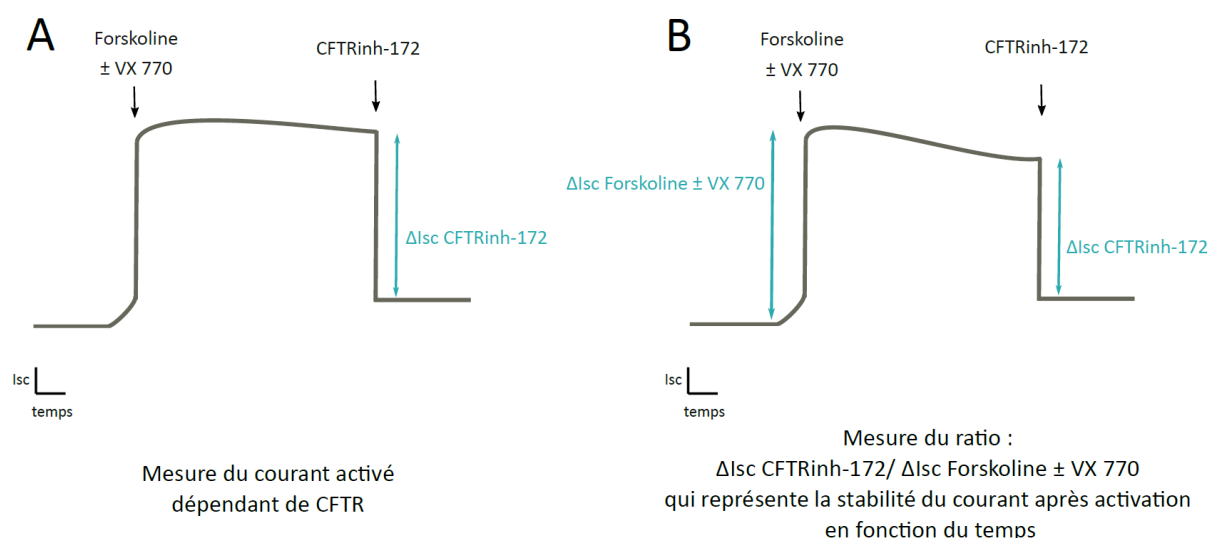


Figure 26 : Paramètres mesurés au cours des expériences en chambre de Ussing

Nous avons, dans un premier temps, regardé l'effet de l'inhibition pharmacologique des PLC par l'inhibiteur U73122 ou son analogue inactif U73343 en comparant entre les deux conditions le ΔI_{sc} CFTRinh-172 vingt minutes après l'activation du canal CFTR. Nous avons observé que l'inhibition des PLC diminue le courant CFTR-dépendant dans les cellules qui expriment la protéine CFTR-WT de manière endogène (16HBE14o-) mais également dans les cellules CFBE41o- qui sur-expriment la protéine CFTR-WT (CFBE-WT) ou qui sur-expriment la protéine CFTR-F508del corrigée par la température (CFBE-F508del). Suite à ces expériences nous avons estimé que les PLC participent à hauteur de 33 % dans le courant CFTR-dépendant activé par la forskoline $\pm$ VX 770. Nous avons ensuite voulu savoir quelles étaient les isoformes de PLC qui rentrent en jeu dans le courant CFTR-dépendant.

Nous nous sommes focalisés sur 3 isoformes de PLC qui sont décrites comme étant exprimées dans les cellules pulmonaires : la PLC δ 1, la PLC γ 1 et la PLC β 3 (Bale et al., 2018; Bezzerri et al., 2011; Rimessi et al., 2018; Vachel et al., 2015; Xu et al., 2013). Après avoir vérifié par western blot que ces trois isoformes étaient exprimées dans nos lignées épithéliales bronchiques, nous avons transfecté des siRNA dirigés contre ces trois protéines dans la lignée 16HBE14o-. Par rapport aux cellules transfectées avec le siRNA contrôle, nous n'avons pas observé de différence significative du courant CFTR-dépendant avec le siRNA PLC δ 1 (ΔI_{sc} CFTRinh-172 = $10,6 \pm 1,9 \mu A/cm^2$ pour la condition siRNA contrôle *versus* $9,1 \pm 1,7 \mu A/cm^2$ pour la condition siRNA PLC δ 1). Nous avons observé, en revanche, une diminution significative du courant CFTR-dépendant avec le siRNA PLC γ 1 (ΔI_{sc} CFTRinh-172 = $10,3 \pm 1,8 \mu A/cm^2$ pour la condition siRNA contrôle *versus* $6,0 \pm 1,6 \mu A/cm^2$ pour la condition siRNA PLC γ 1) et avec le siRNA PLC β 3 (ΔI_{sc} CFTRinh-172 = $7,1 \pm 1,1 \mu A/cm^2$ pour la condition siRNA contrôle *versus* $2,4 \pm 0,3 \mu A/cm^2$ pour la condition siRNA PLC β 3). La PLC γ 1 et la PLC β 3 participent donc au courant CFTR-dépendant dans les cellules qui expriment la protéine CFTR-WT de manière endogène. Pour la suite du projet nous nous sommes concentrés sur la PLC β 3 et nous avons regardé son rôle dans le courant CFTR-F508del corrigé par la température dans les cellules CFBE-F508del et dans le courant CFTR-WT dans les cellules contrôles CFBE-WT. Nous avons observé que la PLC β 3 participe également, à hauteur de 25 %, à la fois dans le courant CFTR-F508del corrigé et dans le courant CFTR-WT. Nous avons ensuite comparé par western blot l'expression totale de la protéine CFTR dans les lignées CFTR-F508del et CFBE-WT transfectées avec le siRNA PLC β 3 ou le siRNA contrôle pour trouver une explication à la diminution du courant CFTR-dépendant observée dans les cellules transfectées avec le siRNA PLC β 3. Curieusement nous avons observé une diminution significative de l'expression de la protéine CFTR dans la lignée CFBE-WT mais cette diminution n'a en retour pas été observée dans les cellules CFBE-F508del. Il est possible que la diminution d'expression de CFTR observée dans les CFBE-WT en présence du siRNA PLC β 3 joue un rôle dans la diminution du courant CFTR-dépendant mais elle ne peut néanmoins expliquer à elle seule cette diminution puisqu'elle concerne pareillement les deux lignées : CFBE-F508del et CFBE-WT. Il faut noter que les western blots CFTR ont été réalisés à partir de lysats totaux et ne témoignent pas de l'expression du canal CFTR à la membrane.

Nous avons ensuite regardé si la diminution de courant observée avec l'inhibition pharmacologique des PLC et celle observée avec la transfection du siRNA PLC β 3 étaient reliées. Pour cela nous avons utilisé l'inhibiteur pharmacologique sur des cellules CFBE-F508del et CFBE-WT transfectées avec le siRNA PLC β 3. Nous avons remarqué que l'inhibiteur pharmacologique U73122 diminue de manière équivalente le courant CFTR-dépendant dans les siRNA PLC β 3 et les siRNA contrôle, ceci dans les deux lignées. Ce résultat semble indiquer que d'autres PLC que l'isoforme PLC β 3 participent au courant CFTR-dépendant. En effet, nous avons observé, dans la lignée 16HBE14o-, que la PLC γ 1 joue aussi un

rôle dans le courant CFTR-dépendant. Cependant la comparaison des ratios ΔI_{sc} CFTRinh-172/ ΔI_{sc} forskoline $\pm$ VX 770 entre l'utilisation de l'inhibiteur pharmacologique des PLC ou la condition siRNA PLC β 3 a révélé que l'inhibiteur des PLC induit une chute du courant CFTR-dépendant qui n'est pas observée pour la transfection avec le siRNA PLC β 3. Ce résultat révèle donc des différences entre, d'un côté, l'effet induit par l'inhibiteur pharmacologique et, de l'autre, celui provoqué par la diminution d'expression de la PLC β 3 par la technique de siRNA.

Le courant CFTR-dépendant enregistré en chambre de Ussing grâce à l'application d'un gradient chlorure est un courant global qui comprend, bien sur, l'activité du canal CFTR, mais également celle d'autres canaux qui participent à la sortie des ions chlorure et qui peuvent être exprimés du côté apical ou basolatéral du pseudo-épithélium. Pour expliquer la chute du courant CFTR-dépendant dans le temps en présence de l'inhibiteur U73122, nous avons cherché à identifier la cible de cet agent pharmacologique. Ainsi les mêmes expériences (inhibition des PLC puis activation du canal CFTR) ont été à nouveau réalisées, mais cette fois en inhibant au préalable les canaux chlorures, autres que CFTR, exprimés soit en apical, soit en basolatéral par le DIDS (4'4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid) dans les lignées CFBE-F508del corrigée et CFBE-WT. Nous avons observé que la chute du courant due à la présence de l'inhibiteur des PLC était toujours observée lorsque le DIDS était disposé du côté basolatéral de la chambre de Ussing mais qu'elle n'était plus observée lorsque le DIDS était disposé du côté apical de la chambre de Ussing. Nous en concluons que les PLC participent au courant chlorure CFTR-dépendant en stimulant d'autres canaux chlorures exprimés du côté apical des cellules épithéliales bronchiques. Dans le but de savoir si ces canaux étaient activés de manière dépendante du Ca^{2+} , nous avons réalisé les mêmes expériences (inhibition des PLC puis activation du canal CFTR) en incubant au préalable les cellules avec le chélateur calcique intracellulaire BAPTA-AM. Il se trouve que même en présence du BAPTA-AM nous avons observé une chute du courant CFTR-dépendant en présence de l'inhibiteur U73122. Nous en concluons que les PLC exercent une action sur des canaux chlorures autres que CFTR et qui ne sont pas sous la dépendance du Ca^{2+} intracellulaire.

Pour finir nous avons regardé l'influence des PLC sur les canaux chlorure activés par le Ca^{2+} (CaCC) via une stimulation par l'UTP. Dans les deux lignées, CFBE-F508del corrigée et CFBE-WT, nous avons observé le même effet, à savoir que la stimulation des canaux CaCC par l'UTP est diminuée en présence de l'inhibiteur pharmacologique des PLC, mais également lorsque les cellules sont transfectées avec le siRNA PLC β 3.

En résumé nous avons mis en évidence un rôle des phospholipases C dans le courant chlorure CFTR-dépendant et également dans le courant chlorure activé par le Ca^{2+} , dans les cellules épithéliales bronchiques CFBE-WT mais aussi CFBE-F508del corrigées.

C. Article

Phospholipase C controls chloride-dependent short-circuit current in bronchial epithelial cells

Chloé Grébert, Frederic Becq, Clarisse Vandebrouck

Laboratoire signalisation et transports Ioniques membranaires, Université de Poitiers

En préparation

Phospholipase C controls chloride-dependent short-circuit current in human bronchial epithelial cells

Chloé Grebert, Frédéric Becq, and Clarisse Vandebrouck

Abstract

Chloride secretion by airway epithelial cells is primordial for water and ion homeostasis and airways surface prevention of infections. This secretion is impaired in several human diseases, including cystic fibrosis, a genetic pathology due to CFTR gene mutations leading to chloride channel defects. A potential therapeutic approach is aiming at increasing chloride secretion either by correcting the mutated CFTR itself or by stimulating non-CFTR chloride channels at the plasma membrane. Here we studied the role of phospholipase C in regulating the transepithelial chloride secretion in human airway epithelial 16HBE14o- and CFBE cells over expressing WT- or F508del- CFTR. Western blot analysis shows expression of the three endogenous PLC isoforms PLC δ 1, PLC γ 1 and PLC β 3 in 16HBE14o- cells. In 16HBE14o- cells we performed Ussing chamber experiments after silencing each of these PLC isoforms or using the PLC inhibitor U73122 or its inactive analogue U73343. Our results show the involvement of PLC β 3 and PLC γ 1 in CFTR-dependent short-circuit current activated by forskolin, but not PLC δ 1. In CFBE-WT CFTR and corrected CFBE F508del CFTR cells, siRNA-PLC β 3 also inhibit CFTR dependent current activated by forskolin and UTP-activated calcium-dependent chloride channels (CaCC). Our study supports the importance of PLC in maintaining CFTR dependent chloride secretion over time, getting maximal CFTR-dependent current and increasing CaCC activation in bronchial epithelial cells.

Keywords: CFTR - Phospholipase C - PLC β 3 - GPCR signalling - CaCC - CFBE epithelial cells

Introduction

The Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channel is expressed in epithelial cells (airways, intestines, pancreas) and controls chloride, bicarbonate and water transport [1]. CFTR gene mutations lead to Cystic Fibrosis (CF), a lethal disease characterized by pancreatic insufficiency, pulmonary obstructions, and infertility, among other symptoms. In the case of the most common CFTR mutation F508del-CFTR, the protein is prematurely degraded, therefore not expressed at the plasma membrane (PM) and not functional. Therefore, most of the therapeutic strategies are aiming at correcting the abnormal cell location, stability and channel activity of F508del-CFTR [2].

CFTR activation depends on MgATP binding on nucleotide binding domains and phosphorylation of the R domain mediated by PKA, PKC or tyrosine kinases [3]–[7]. More recently, an increasing number of studies also showed the importance of calcium or pathways activated by calcium in CFTR activation [8], [9]. It is well known that phospholipase C (PLC) are responsible for increasing intracellular calcium by hydrolyzing phospholipids. To date, 13 isoforms of PLC in mammalian cells have been characterised [10]. Some are tissue-specific, and some have particular catalytic domains and physiological functions (for review, see [10]), but they all cleave phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) in diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) [11]. This lipid hydrolysis potentially activates PKC and calcium signalling, two pathways involved in CFTR potentiation. For example, exchange protein directly activated by cAMP (EPAC), a protein involved in PLC activation and calcium mobilization [12] contributes to CFTR dependent chloride secretion by IBMX/forskolin [13], H₂O₂ [14], deoxycholic acid and chenodeoxycholic acid (CDCA) or even forskolin alone [15]. Moreover calmodulin, once activated by calcium, directly interacts with the R domain of CFTR to modulate its activity [9]. Ivonnet et al., demonstrated that CFTR-dependent I_{sc} activation by H₂O₂ in differentiated normal human bronchial epithelial (NHBE) cultures was mediated by G protein-coupled receptor (GPCR) signaling, involving an increased [Ca²⁺]_i and soluble adenylylase (AC) activation, with the assistance of EPAC and PLC [14]. Domingue et al., showed that in human colonic T84 cells, CDCA and carbachol stimulation of CFTR dependent I_{sc} were both decreased after inhibition of PLC [15].

Therefore, there is extensive evidence in favour of a physiological involvement of PLC signalling in CFTR activity. The aim of our study was to investigate whether PLC could play a role in forskolin-stimulated CFTR-dependent short circuit current in normal airway epithelial 16HBE14o-, CFBE-WT cells and in temperature corrected CFBE-F508del cells. We identified PLCβ3 and PLCγ1 as the major isoforms, and investigated its function in human airway epithelial cells. We propose that these PLC isoforms participate in bronchial chloride secretion in either WT-CFTR and corrected F508del-CFTR expressing cells in two different manners: one involving non-CFTR chloride channels and one involving CFTR.

A better understanding of WT-CFTR and F508del-CFTR is crucial in the context of CF to potentiate mutated CFTR and we will describe here a way of CFTR regulation involving phospholipases C.

Materials and methods

Reagents

Amiloride (A7410), UTP (Uridine 5' triphosphate, U6875), forskolin (F6886), U73343 (U6881), U73122 (U6756), fibronectin (F0895), penicillin streptomycin (P0781), DIDS (4,4' Diisothiocyanatostilbene 2,2' disulfonic acid disodium, D3514), rabbit polyclonal anti human actin (1/5 000, A2066), goat anti mouse

secondary antibody conjugated to peroxidase (1/10 000, A0168) and goat anti rabbit secondary antibody conjugated to peroxidase (1/10 000 : A0545) were purchased from Sigma-Aldrich; CFTRinh-172 (219670), BAPTA-AM (196419), mouse monoclonal anti human CFTR (1/1 000, MAB3480) and chemiluminescent HRP substrate (WBKLS0500) were from Merck Millipore; Ivacaftor (VX770, S1144) was from Selleckchem; mouse monoclonal anti human PLC δ 1 (1/200, (D-7): sc-393464), mouse monoclonal anti human PLC γ 1 (1/200 (E-12): sc-7290), mouse monoclonal anti human PLC β 3 (1/200 (D-7): sc-133231), mouse monoclonal anti human NaK ATPase (1/1 000, 21712) were from Santa Cruz Biotechnology; duplex PLC δ 1 siRNA (20 mM, sc-40841), duplex PLC γ 1 siRNA (40 mM, sc-29452), duplex PLC β 3 siRNA (20 mM, sc-36272) control siRNA (control A siRNA, 20 or 40 mM, sc-37007) were from Santa Cruz Biotechnology; Puromycin (A1113803) was from ThermoFischer; cOmpleteTM protease inhibitor cocktail (11836170001) was from Roche; INTERFERin[®] (409-10) was from Polyplus transfection.

Cell culture

Non-CF human bronchial epithelial cell line (16HBE14o-) was cultured in Eagle Minimum Essential Medium (BE12-662F, Lonza) supplemented with 1.8 mM L-glutamine, 10 % foetal bovine serum (FBS) and 0.05 mg/mL plasmocin. CF human bronchial epithelial cell lines stably expressing WT-CFTR (CFBE WT) or F508del-CFTR (CFBE F508del) were cultured in minimum essential medium (10370 047, Gibco) supplemented with 1.8 mM L-glutamine, 10 % foetal bovine serum (FBS), 1 % penicillin/streptomycin and 0.005 mg/mL puromycin as selective antibiotic. For all experiments, cells were grown at air-liquid interface until tight junction formation (about 7-10 days) on fibronectin-coated permeable supports (12 mm SnapwellTM insert, 1.12cm² surface area (3407, Corning)). All cells were maintained at 37°C in 95 % O₂ – 5 % CO₂.

Western Blotting

16HBE14o-, CFBE-WT and CFBE-F508del cells were lysed with a lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 1mM Na₃VO₄ and 0.5% (vol/vol) NP40 supplemented with protease inhibitor cocktail at 20 µg/mL. Cells were incubated at 4°C for 30 min and centrifuged at 20,000 × g for 5 min. After centrifugation, the supernatants were collected and total proteins were quantified using the bicinchoninic acid assay (BCA). 50 µg of total proteins were solubilized in Laemmli sample buffer (at a 1:5 dilution), run on a 10 % SDS/PAGE gel and transferred onto nitrocellulose membranes 0.45 µm (10600008, GE Healthcare). Membranes were blocked with 5 % (w/v) skim milk powder in Phosphate Buffer Saline (PBS) 0.1 % Tween 20 and incubated at 4°C overnight with primary antibodies. Then, membranes were incubated with corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary

antibodies for 1h in saturation buffer at 4°C and membranes were incubated with chemiluminescent HRP substrate for 2 min. Chemiluminescent signals were acquired using GeneGnome (Syngene) and signal intensity was quantified using ImageJ software.

Short-circuit current (Isc) measurements

Cells grown on Snapwell™ inserts (16HBE14o-, CFBE-WT or temperature corrected CFBE-F508del at 27°C for 24 hours [16]) were mounted in Ussing chambers (Physiologic instrument, San Diego, CA). Cells were bathed in asymmetric apical and basolateral buffer allowing a basal to apical chloride gradient. The apical solution contained in mM; 1.2 NaCl, 115 Na gluconate, 25 NaHCO₃, 1.2 MgCl₂, 4 CaCl₂, 2.4 KH₂PO₄, 1.24 K₂HPO₄, 10 mannitol adjusted to pH 7.4 with NaOH. The basolateral solution contained in mM; 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 1.2 MgCl₂, 1.2 CaCl₂, 2.4 KH₂PO₄, 1.24 K₂HPO₄, 10 glucose adjusted to pH 7.4 with NaOH. Short-circuit currents (Isc) were monitored using a VCC MC2 voltage clamps (Physiologic instrument) and recorded using Acquire and Analysis software (Physiologic instrument). Apical and basolateral solutions were maintained at 35-37°C for 16HBE14o- and CFBE-WT and at 33-35°C for CFBE-F508del, to minimize the loss of F508del-CFTR- dependent short circuit current that appears around 37°C [17]. Both solutions were gassed with 95 % O₂ – 5 % CO₂. Pharmacological reagents were added to the apical bathing solution: at the beginning of all experiments amiloride (100 µM) was added to inhibit sodium reabsorption, and 20 min later, CFTR activation was induced by forskolin (10 µM) ± VX770 (1 µM), a CFTR potentiator. Finally, CFTR-inh172 (10 µM) was added to inhibit CFTR specific Cl⁻ secretion. The use of UTP (100 µM) after CFTR inhibition has been used to control calcium activated chloride channels (CaCC) activity. Variations of CFTR dependent short circuit current in response to the addition of drugs were measured and represented on graphs as Δ Isc.

Small interfering RNA transfection

Decreased expression of PLC δ 1, PLC γ 1 or PLC β 3 were performed using siRNA transfections of polarized 16HBE14o- and CFBE41o- stably expressing the WT-CFTR or F508del-CFTR cell lines before Ussing chambers experiments. Duplex PLC δ 1, PLC γ 1, and PLC β 3 siRNA or control siRNA were transfected using INTERFERin® during cell seeding, according to the reverse transfection protocol provided by the manufacturer, to allow siRNA membrane-crossing before tight-junction formation, as further described in [18]. After 2 days, media was replaced, and cells were grown under air-liquid interface on Snapwell™ inserts for 5 more days.

Statistics

Results are reported as means $\pm$ SEM of minimum 6 observations. Differences were assessed using the Wilcoxon paired test, since for all experiments each treated insert had its control counterpart, with

P<0.05 considered significant (*). *P<0.05, **P<0.01. Tests were performed using GraphPad Prism 6 software.

Results

Phospholipase C pharmacological inhibition decreases corrected F508del- and WT- CFTR dependent Isc

First, we used the polarized bronchial epithelial 16HBE14o- cells, endogenously expressing WT-CFTR, to study the consequence of blocking PLC on CFTR-dependent short-circuit current (noted hereafter Isc-CFTR). These cells, grown into an air-liquid interface, were mounted in Ussing chambers, forskolin (10 μ M) was added to activate CFTR and 20 min later CFTR was blocked with its specific inhibitor CFTRinh-172 (10 μ M). We determined Δ Isc CFTRinh-172 as it represents the CFTR-dependent fraction of the global Isc (Fig. 1). The addition of the broad-spectrum PLC inhibitor U73122 (3 μ M) before forskolin activation significantly reduced Isc-CFTR compared to U73343 addition (3 μ M), its inactive analogue (Fig. 1A). Then we tested the effect of PLC inhibition on temperature-corrected F508del-CFTR activity. To identify the role of PLC in F508del-CFTR activity, we used the CFBE cell line stably transfected with F508del-CFTR and its control stably expressing WT-CFTR (Fig. 1B-C). We showed that PLC inhibition decreases both corrected F508del-CFTR and WT-CFTR dependent Isc activated by forskolin + VX770 or forskolin alone, respectively.

PLC silencing in 16HBE14o- confirms their participation to endogenous WT-CFTR- dependent Isc activated by forskolin

In order to identify the PLC isoforms involved in CFTR-dependent Isc, we focused on the 3 isoforms known to be expressed in bronchial cells [19]–[21]: PLC δ 1, PLC γ 1, and PLC β 3. By western blotting experiments, we showed that all three isoforms are expressed in our cell models (Fig. 2). Then, we undertook a silencing strategy to downregulate the three PLC isoforms and compared the Isc-CFTR. Determination of the Δ Isc CFTRinh-172 shows that PLC δ 1 silencing did not affect CFTR-dependent Isc (Fig. 3A and D). On the contrary, PLC γ 1 silencing, or PLC β 3 silencing, decreased CFTR-dependent Isc by 50% (Fig. 3B-D). The transfection efficiency of PLC δ 1, PLC γ 1 and PLC β 3 was controlled by western blotting after Ussing chamber experiments and revealed a significant reduction of the three isoforms expression (Fig. 3E-F). Our results showed that PLC β 3 and PLC γ 1 are involved in endogenous WT-CFTR potentiation when activated by forskolin.

PLC β 3 silencing decreases corrected F508del- and WT-CFTR-dependent I_{sc} in CFBE cells

Silencing the three PLC isoforms in 16HBE14o- cells indicates that silencing PLC β 3 is more prone to decrease forskolin-activated I_{sc} compared to other PLC isoforms. We then measured the effect of PLC β 3 silencing on CFTR-dependent I_{sc} in the CFBE cell lines. Figure 4 shows that PLC β 3 silencing significantly reduced CFTR-dependent I_{sc} activated by forskolin + VX770 in corrected CFBE-F508del cells or by forskolin alone in CFBE-WT cells (Fig. 4A-B). We performed Western blot experiments with the cells on inserts mounted in Ussing chambers. We measured a 50% reduction of PLC β 3 protein expression in siRNA conditions compared to control siRNA (Fig. 4C-D). Since siRNA transfections were performed 7 days before short-circuit measurement experiments, we hypothesized that PLC β 3 silencing over a week could have consequences on cellular protein expression as it has already been shown that DAG modulates membrane protein expression [22]. Therefore, we achieved western blotting experiments to control CFTR expression in PLC β 3 siRNA and control siRNA transfected CFBE cells (Fig. 4E). PLC β 3 siRNA transfection significantly reduced total CFTR protein expression in WT-CFTR expressing but not in F508del-CFTR expressing CFBE cells.

PLC pharmacological inhibition also decreases CFTR-dependent I_{sc} in PLC β 3 siRNA transfected cells

To assess whether PLC pharmacological inhibition and PLC β 3 silencing could lead to the same effect on CFTR-dependent I_{sc}, CFBE-F508del and CFBE-WT cells transfected with PLC β 3 siRNA were treated with U73122. Figure 5 shows that adding U73122 decreases both control siRNA and PLC β 3 siRNA transfected Δ I_{sc} CFTRinh-172 in corrected CFBE-F508del and CFBE-WT cells compared to inactive analogue treatment, i.e. U73343. We compared the slope, reflecting the instability of CFTR dependent short circuit current over time, for each experiment, by measuring Δ I_{sc} CFTRinh-172 to Δ I_{sc} forskolin $\pm$ VX770 ratio in cells treated with either U73122 or U73343 (Fig. 6A-B), PLC β 3 siRNA and control siRNA transfected CFBE cells (Fig. 6C-D) and between both U73122/inactive analogue plus PLC β 3 siRNA/control siRNA treated CFBE cells (Fig. 6E-F). In fact, for both corrected F508del-CFTR and WT-CFTR cells, Δ I_{sc} CFTRinh-172 to Δ I_{sc} forskolin $\pm$ VX770 ratio is decreased by U73122 (about 0.6 μ A/cm² and 0.8 μ A/cm², respectively) compared to inactive analogue (0.8 μ A/cm² and 1 μ A/cm², respectively) while it does not change between PLC β 3 siRNA and control siRNA conditions (about 0.8 μ A/cm² and 1 μ A/cm², respectively). These results reveal that CFTR-dependent I_{sc} is stable over time in PLC β 3 siRNA transfected cells but decreases when PLC pharmacological inhibition is used. With U73122, for both corrected F508del-CFTR and WT-CFTR cells, Δ I_{sc} CFTRinh-172 to Δ I_{sc} Forskolin $\pm$ VX770 ratio of PLC β 3 siRNA transfected cells is significantly decreased, in the same proportion as for control transfected cells (about 0.6 μ A/cm² and 0.8 μ A/cm², respectively). Taken together, it appears that PLC

pharmacological inhibition and PLC β 3 silencing modulate CFTR-dependent *I*_{sc} through two different mechanisms.

Decreased CFTR-dependent *I*_{sc} by PLC pharmacological inhibition is cancelled by DIDS

Next, we tested the effect of blocking basolateral or apical non-CFTR chloride channels by adding 4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS), a non-CFTR chloride channel inhibitor (Fig. 7), since DIDS is known to be deprotonated in aqueous solutions and therefore cannot go through biological membranes [23]. Adding DIDS to the basolateral chamber before U73122 did not affect CFTR-dependent *I*_{sc} compared to DMSO condition in CFBE-F508del and CFBE-WT cells according to the ΔI_{sc} CFTRinh-172 to ΔI_{sc} Forskolin $\pm$ VX770 ratio (about 0.6 μ A/cm²). However, the addition of DIDS to the apical chamber before U73122 cancelled CFTR-dependent *I*_{sc} decrease compared to DMSO condition according to the ΔI_{sc} CFTRinh-172 to ΔI_{sc} Forskolin $\pm$ VX770 ratio (about 0.8 μ A/cm² and 1 μ A/cm² for CFBE-F508del and CFBE-WT, respectively). This result shows that phospholipase C also probably potentiates chloride-dependent *I*_{sc} through non-CFTR chloride channels. Then, we tested the effect of blocking intracellular calcium with the cell permeable calcium chelator BAPTA-AM on CFTR dependent *I*_{sc} in presence of U73122 compared to control-treated cells (Fig. 8). The addition of BAPTA-AM did not affect CFTR dependent *I*_{sc} as measured by the ΔI_{sc} CFTRinh-172 to ΔI_{sc} Forskolin $\pm$ VX770 ratio (about 0.5 μ A/cm² and 0.7 μ A/cm², respectively). Consequently, since the chloride channels inhibited by U73122 are activated even in the presence of BAPTA-AM, we can argue that the *I*_{sc} decrease due to PLC inhibition is not dependent on intracellular calcium. We also measured CFTR-dependent short-circuit current in PLC β 3 siRNA or control siRNA transfected CFBE cells in presence of DIDS in the apical chamber. Our results show that in our experimental condition ΔI_{sc} CFTRinh-172 was still diminished in PLC β 3 siRNA transfected CFBE cells compared to control siRNA transfected CFBE cells (data not shown). This is in agreement with the fact that PLC pharmacological inhibition and PLC silencing act on CFTR-dependent *I*_{sc} through two resolutely different ways.

Both PLC pharmacological inhibition and PLC β 3 silencing decrease CaCC activation in corrected CFBE F508del-CFTR and CFBE WT-CFTR cell lines

PLCs are involved in DAG and IP₃ production once activated, and therefore are controlling intracellular [Ca²⁺] increase [24]. Uridine triphosphate (UTP) is known to activate PLC pathway by activating P2Y receptors and its corresponding G protein [25], leading to a rise of intracellular [Ca²⁺], which can in turn, stimulates chloride channels activated by intracellular calcium (CaCC) at the plasma membrane. P2Y2 and P2Y4 receptors are expressed in the human epithelium and are activated by UTP [26], [27].

In all our experiments, UTP was added at the end of the recordings, just after CFTR inhibition. ΔI_{sc} UTP ($\mu A/cm^2$) was measured to appraise PLC's involvement in CaCC activation (Fig. 9). We observed that in the presence of U73122 before forskolin activation, ΔI_{sc} UTP was decreased compared to its inactive analogue in both corrected F508del-CFTR and WT-CFTR expressing CFBE cells (Fig. 9A-B). We also observed that ΔI_{sc} UTP was decreased in PLC β 3 siRNA compared to control siRNA transfected CFBE cells (Fig. 9C-D). Finally, we showed that PLC inhibition can further decrease ΔI_{sc} UTP in PLC β 3 siRNA transfected CFBE cells (Fig. 9E-F), as it was the case with ΔI_{sc} CFTRinh-172. This set of experiments allowed us to conclude that PLC, and especially the PLC β 3 isoform, is involved in CaCC activation by UTP in both corrected CFBE-F508del and CFBE-WT cells.

Discussion

It was already shown that PLC are involved in chloride secretion in CFTR expressing bronchial and colonic cells [14], [15], [28], [29]. In this study, we identified PLC as a component controlling the chloride conductance activated by forskolin and UTP in polarized bronchial pseudo epithelia expressing WT- but also F508del- CFTR. Indeed, we showed that corrected F508del- and WT- CFTR-dependent short circuit current stability over time depends on PLC, which exerts its effect through a way involving apical chloride channels. In the same time, we showed that PLC γ 1 and PLC β 3 were decisive for maximal CFTR-dependent I_{sc} activation by forskolin in 16HBE14o- cells. Then, we tested the function of PLC β 3 in both CFBE-WT cells and temperature corrected CFBE-F508del cells. We found that PLC β 3 expression is crucial, in both cell lines, to get maximal CFTR-dependent short circuit-current activation after forskolin stimulation. Finally, our experiments revealed that PLC β 3 contributes to UTP stimulated I_{sc} .

Ussing chambers experiments allowed us to record ions transported by CFTR across bronchial epithelium but also by other channels, including chloride ones. Indeed, we saw that when DIDS was added in the apical chamber, U73122 failed to decrease short-circuit current over time after forskolin stimulation, meaning that chloride channels blocked by DIDS, and expressed at the apical side of bronchial epithelium, are involved in short circuit-current. Three non-CFTR chloride channels are expressed in bronchial epithelial cells: the outwardly rectifying chloride channel (ORCC) [30], SLC26A9 [31], [32], and calcium ion activated chloride channels such as TMEM16A [33], [34]. As the calcium chelator, BAPTA-AM, did not affect the impact of U73122 on CFTR-dependent short-circuit current stability over time, we can exclude TMEM16A to be the target of U73122 inhibitor. Both ORCC and SLC26A9 are sensitive to DIDS [32], [35], but it has been proposed that ORCC is rather expressed in the basolateral membrane of lung epithelial cells [35]. Some studies showed that SLC26A9 requires CFTR activity for its proper functioning and reported a defective SLC26A9 activity that is corrected by VX 809,

a CFTR corrector [31], [36]. It seems that SLC26A9 contributes to CFTR-dependent *I*_{sc} and depends on CFTR activity; thus, we suggest that the endogenous DIDS sensitive channel potentiated by PLC in CFTR expressing bronchial cells could be SLC26A9.

According to manufacturer instructions, U73122 acts as a specific inhibitor of G protein-mediated phospholipase C, which include PLC β (1-4), PLC γ (1-2), PLC ϵ , PLC δ (1-4), PLC η (1-2), and PLC ζ isotypes, which all can be directly or indirectly activated, through pathways including calcium signaling [37], [38]. Among these PLC families, PLC β 1 and PLC β 4 are mostly expressed in neural tissue, PLC β 2 and PLC γ 2 in hematopoietic cells, PLC η are found in neuron enriched regions and PLC ζ only in spermatids whereas PLC β 3, PLC γ 1, PLC δ (1-4) and PLC ϵ have a widespread distribution and could be expressed in airway epithelium [39] [38] [11]. Moreover, PLC β 3 and PLC ϵ activities are not under the control of intracellular calcium and are therefore potentially implicated in CFTR dependent *I*_{sc} stability over time after forskolin stimulation.

As underlined earlier, PLC β 3, PLC γ 1, PLC δ (1-4) and PLC ϵ could as well be expressed in bronchial epithelial cells. Western blotting experiments confirmed the endogenous expression of at least PLC β 3, PLC γ 1 and PLC δ 1 in bronchial cells expressing either WT- or F508del- CFTR. We also identified, by siRNA transfection, PLC γ 1, and PLC β 3 as participating in CFTR-dependent *I*_{sc} in polarized 16HBE14o- and we also confirmed PLC β 3 involvement in CFTR-dependent *I*_{sc} in corrected F508del-CFTR and WT-CFTR transfected CFBE cells. Although CFTR expression was significantly decreased in PLC β 3 siRNA transfected CFBE-WT cells, the decreased expression of CFTR was not evident in CFBE-F508del cells. This decrease of total CFTR expression in PLC β 3 siRNA transfected CFBE-WT cells is probably related to a decreased plasma membrane CFTR expression and associated to a decreased CFTR-dependent *I*_{sc}. However, considering that CFTR dependent-*I*_{sc} is diminished in all experiments involving CFBE-WT and CFBE-F508del, we conclude that the decreased *I*_{sc} after siRNA transfections of PLC β 3 is not only due to a decreased in CFTR expression.

PLC β and CFTR share a common structural domain, which is a PDZ binding motif (class 1 postsynaptic density 95/disk large/Zona occludens 1) [40], [41] and functional links have been established between Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 and 2 (NHERF1/2) and both PLC β 3 [42], [43] and CFTR [44] [45]. NHERF 1 interacts with the C terminal domain of CFTR and promotes CFTR plasma membrane localization [46] [44]. NHERF1 and NHERF2 play a role in CFTR phosphorylation, and NHERF1 also increases CFTR oligomerization [47]. Thus we make the assumption that PLC β 3 could act as an adaptor protein that increases NHERF-CFTR interaction and CFTR mediated chloride secretion.

On the other hand, PLC γ 1 does not have a PDZ binding motif and its involvement in CFTR dependent current in 16HBE14o- cells cannot be related to NHERF. Nevertheless, PLC γ 1 and CFTR both share an affinity for SHANK2 (SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2) (Fig. 10). It has been shown that SHANK2 negatively regulates CFTR in NIH/3T3 cells and CHO cells [48], [49]. Therefore, we could hypothesize that PLC γ 1, by its binding with SHANK2, could take part in CFTR-dependent current by decreasing CFTR-SHANK2 interaction.

It has already been published that PLC are related to calcium activated chloride channels stimulation in CFTR expressing cells [29], [50]. Our results support this hypothesis by showing that CaCC activation by UTP is decreased in both corrected CFBE-F508del and CFBE-WT cells in the presence of the PLC inhibitor U73122. More specifically, we identified that the PLC β 3 isoform contributes in CaCC activation as PLC β 3 silencing decreased Δ Isc UTP measured in Ussing chambers. UTP is a ligand of the P2Y2 and P2Y4 Gq/11 coupled GPCR that activate PLC β isoforms [25], [51]. Since U73122 also diminished Δ Isc UTP in PLC β 3 siRNA transfected cells, we suppose that other PLC isoforms, activated by P2Y coupled GPCR, could be involved in CaCC activation.

Our study supports the fact that PLC is beneficial for chloride secretion in airway epithelial cells and it has been published that PLC also promotes pancreatic secretion in CF pancreatic cells [52]. Indeed, Zhu et al., showed that decreased expression of the protein NYD SP27, which has inhibitory effects on PLC coupled processes, enhance PKC activity, ATP-induced calcium increase and forskolin-induced Isc responses in human CF pancreatic duct cells. From another side, PLC has also been associated with negative impact, especially during inflammatory exacerbation where PLC β 3 increase IL-8 secretion in human bronchial epithelial cells exposed to *P. aeruginosa* [21], [53].

We found here that PLC β 3 are involved in WT- and F508del- CFTR-dependent Isc activation by forskolin and that PLC are involved in alternative non-CFTR chloride transport and support CFTR-dependent chloride secretion over time. Taken together, specific stimulation of PLC could be a way to improve lung functions of CF patients.

Acknowledgements

We thank the French association “Vaincre la mucoviscidose” for supporting our laboratory, Dr Lionel Froux for his valuable discussions and helpful comments on the manuscript and Ms Sandra Mirval for her technical assistance.

Figures

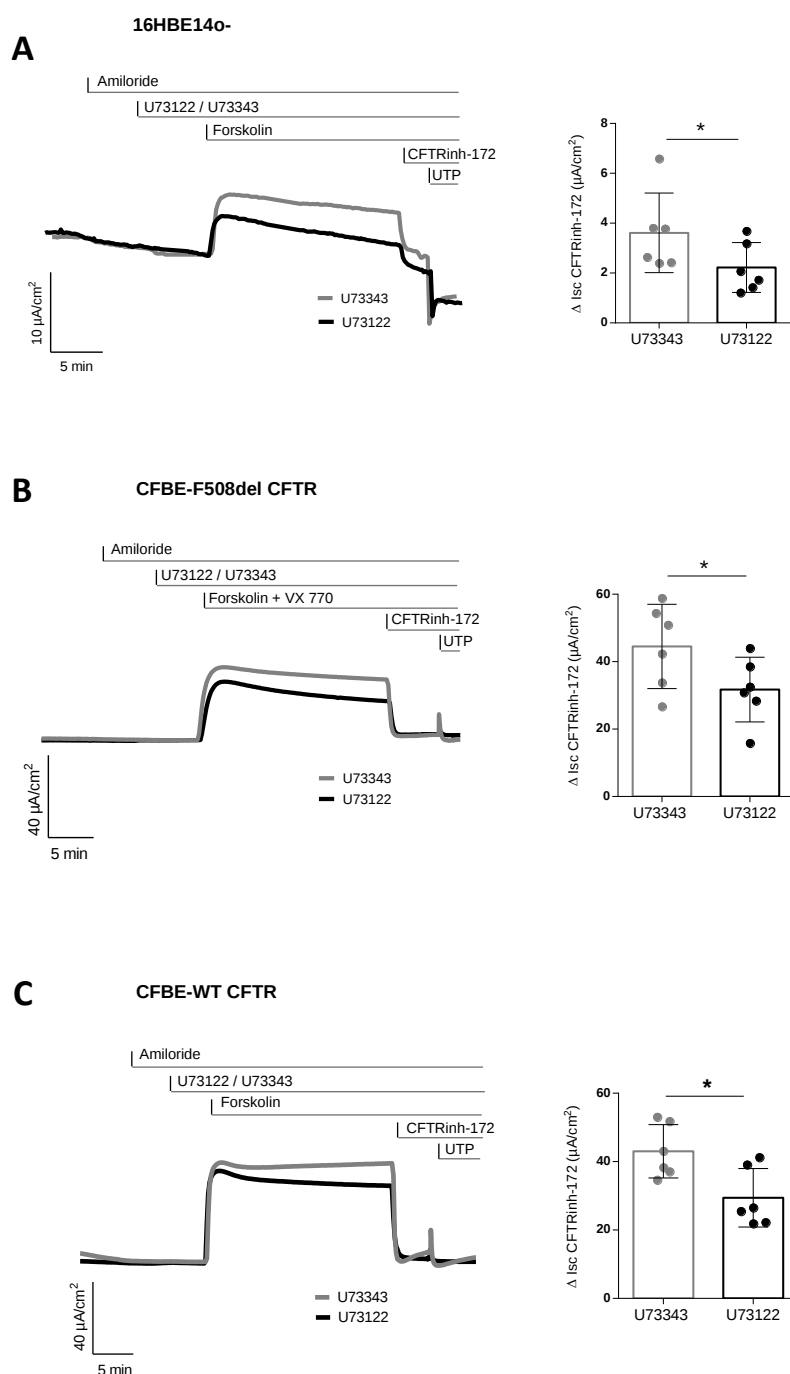


Figure 1: Phospholipase C inhibition decreases WT- and temperature corrected F508del- CFTR-dependent short-circuit current. A, B and C left: time course of short-circuit current (I_{sc}) in presence of PLC inhibitor (U73122, 3 μ M) or its inactive analogue (U73343, 3 μ M) before cAMP stimulation in Ussing chambers. **A:** polarised bronchial epithelial non CF cells 16HBE14o- were stimulated by forskolin 10 μ M. **B:** temperature corrected polarised bronchial epithelial CFBE cells over-expressing F508del-CFTR were stimulated by forskolin 10 μ M + VX770 1 μ M. **C:** polarized bronchial epithelial CF cells over-expressing WT-CFTR were stimulated by forskolin. **Right:** corresponding bar graphs of ΔI_{sc} CFTRinh-172 for U73343 and U73122. Mean $\pm$ SEM Wilcoxon paired test, p-value 16HBE14o-, CFBE-F508del and CFBE-WT: 0.0313.

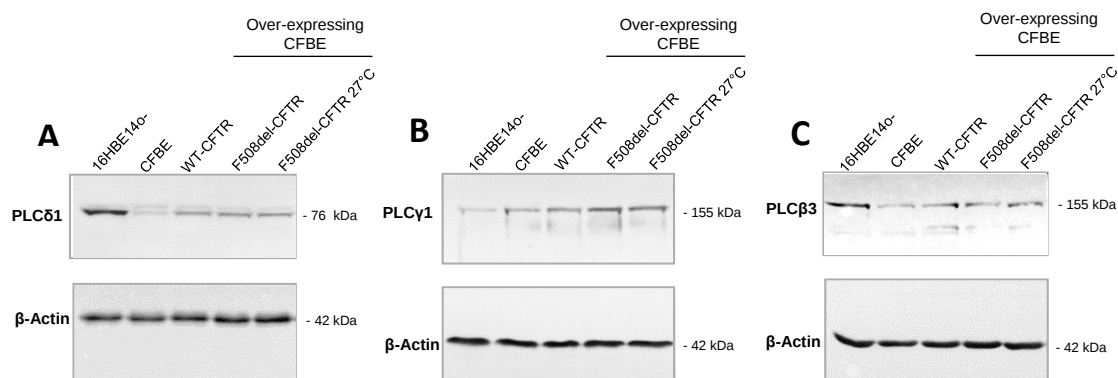


Figure 2: PLCδ1, PLCγ1 and PLCβ3 are endogenously expressed in WT-CFTR and F508del-CFTR expressing pulmonary epithelial cell lines. Representative western blots developed against PLCδ1 (A), PLCγ1 (B) and PLCβ3 (C) and loading control β-actin in polarised bronchial epithelial non CF cells (16HBE14o8), CF parental cells (CFBE), CFBE cells over-expressing WT-CFTR and CFBE cells over-expressing F508del-CFTR non corrected or corrected at 27°C during 24 hours.

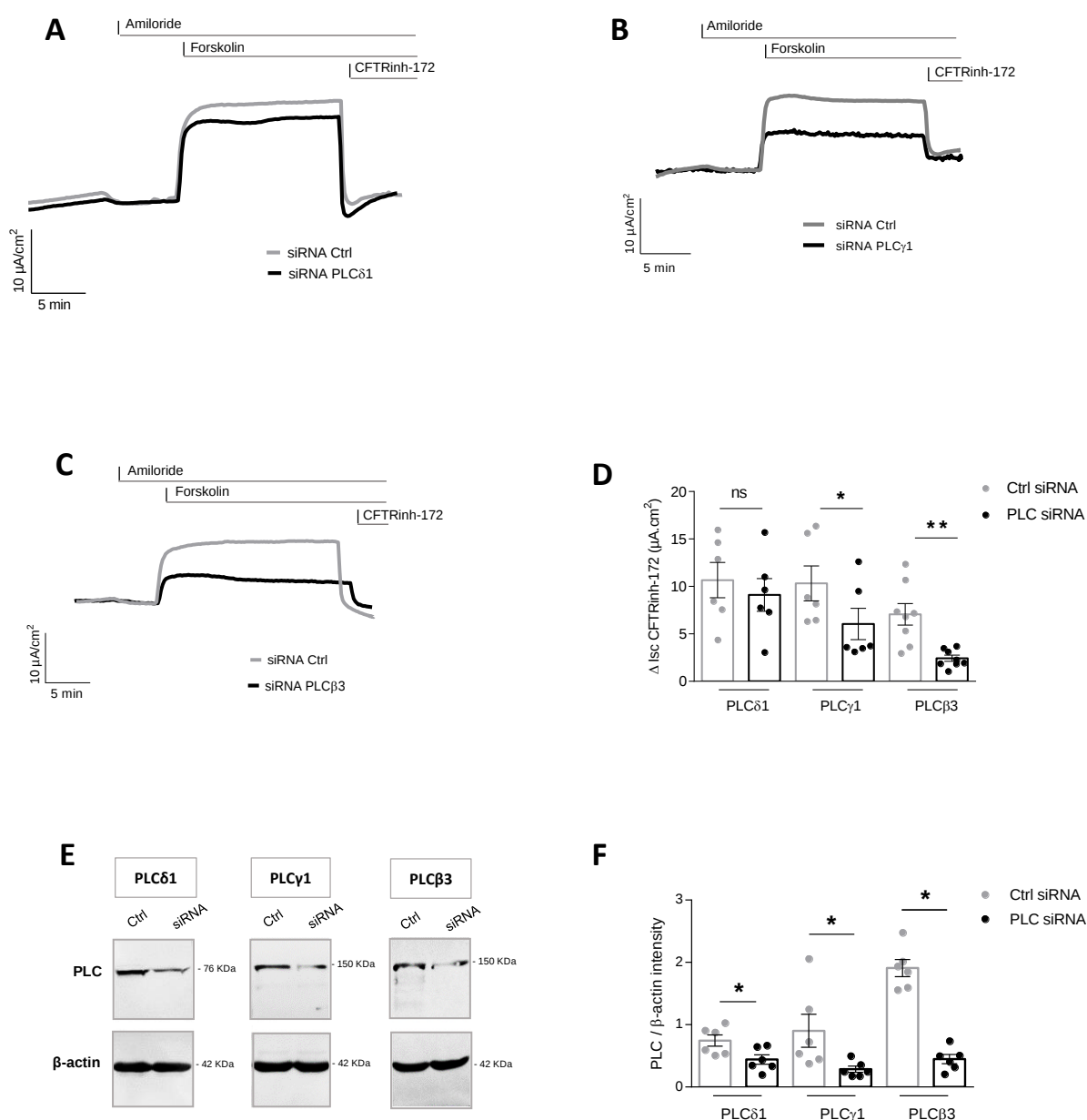


Figure 3: PLC γ 1 and PLC β 3 are involved in CFTR-dependent short-circuit current activated by forskolin in 16HBE cell line. **A, B and C:** time course of short-circuit current (I_{sc}) after forskolin activation (10 μ M) with PLC δ 1 (**A**), PLC γ 1 (**B**) or PLC β 3 (**C**) downregulation by siRNA and respective control siRNA in polarised bronchial epithelial non CF cells 16HBE14o-. **D:** corresponding bar graphs of ΔI_{sc} CFTRinh-172 to quantify CFTR involvement in forskolin activation. Mean $\pm$ SEM Wilcoxon paired test, p-value PLC δ 1 siRNA: 0.2188; p-value PLC γ 1 siRNA: 0.0313; p-value PLC β 3 siRNA: 0.0078. **E and F:** representative western blots (**E**) and corresponding bar graphs (**F**) of PLC δ 1, PLC γ 1 and PLC β 3 expression controlled after Ussing chambers experiments in order to assess silencing efficiency. Mean $\pm$ SEM Wilcoxon paired test, p-value for PLC δ 1, PLC γ 1 and PLC β 3 siRNA: 0.0313.

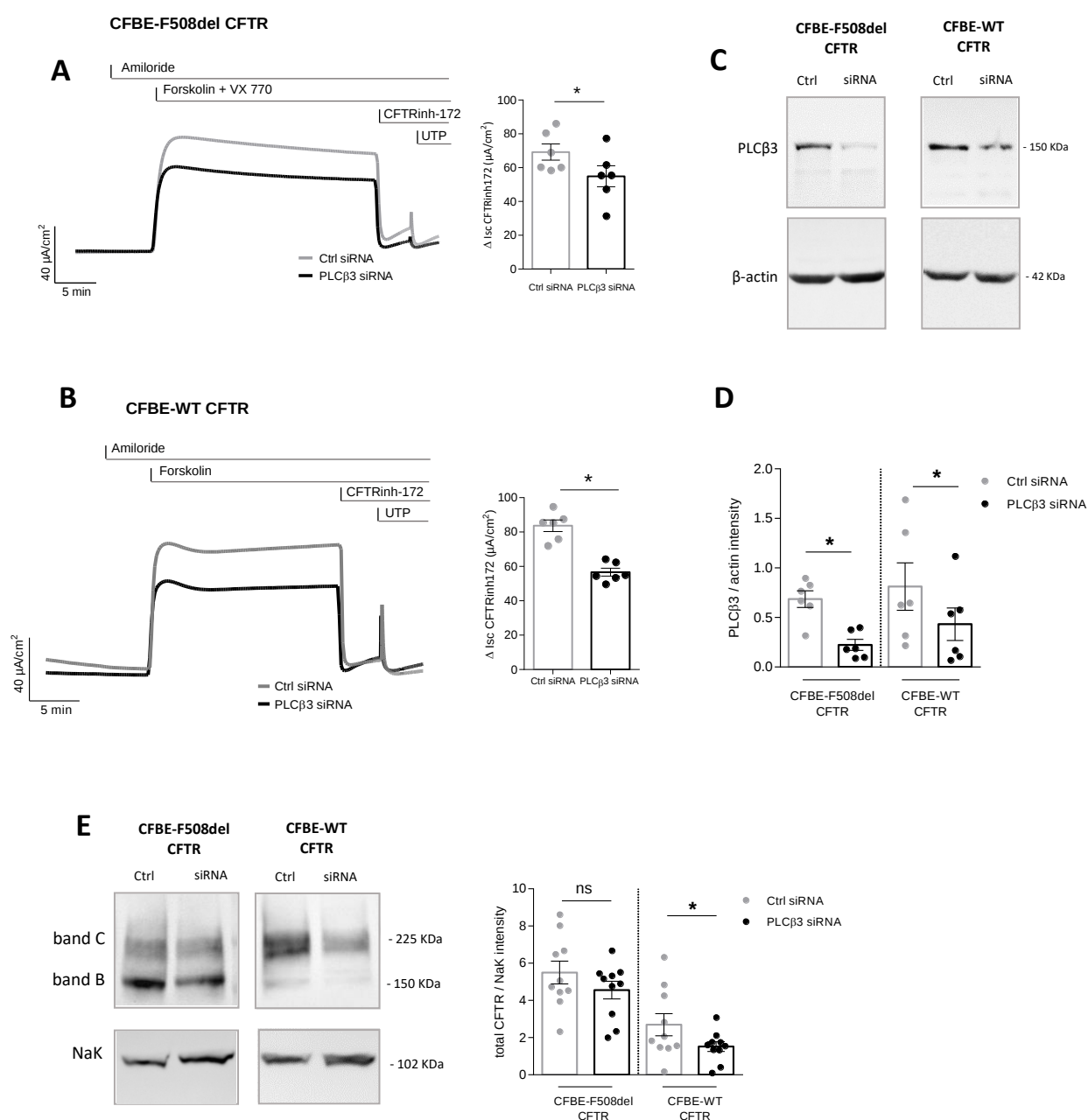


Figure 4: Silencing of PLC β 3 by siRNA decreases CFTR-dependent short-circuit current activation in temperature corrected CFBE-F508del CFTR and CFBE-WT CFTR cells. **A** and **B**: time course of short-circuit current (I_{sc}) of polarized bronchial epithelial CF cells with PLC β 3 siRNA or control siRNA when stimulated by forskolin 10 μ M + VX770 1 μ M in CFBE-F508del cells (**A**) or forskolin 10 μ M in CFBE-WT cells (**B**) and corresponding bar graphs of ΔI_{sc} CFTRinh-172 CFTR for each cell line. Mean $\pm$ SEM Wilcoxon paired test, p-value for CFBE-F508del and CFBE-WT: 0.0313. **C** and **D**: representative western blots (**C**) and corresponding bar graphs (**D**) of PLC β 3 expression controlled after Ussing chambers experiments in each cell line, in order to assess silencing efficiency. Mean $\pm$ SEM Wilcoxon paired test, p-value for CFBE-F508del and CFBE-WT: 0.0313. **E**: representative western blots developed against CFTR and loading control NaK in polarized bronchial epithelial CF cells over-expressing F508del-CFTR after temperature correction and in polarised bronchial epithelial CF cells over-expressing WT-CFTR and respective bar graphs of total CFTR / NaK intensities for each condition. Mean $\pm$ SEM Wilcoxon paired test, p-value for CFBE-F508del: 0.2324 and p-value for CFBE-WT: 0.0195.

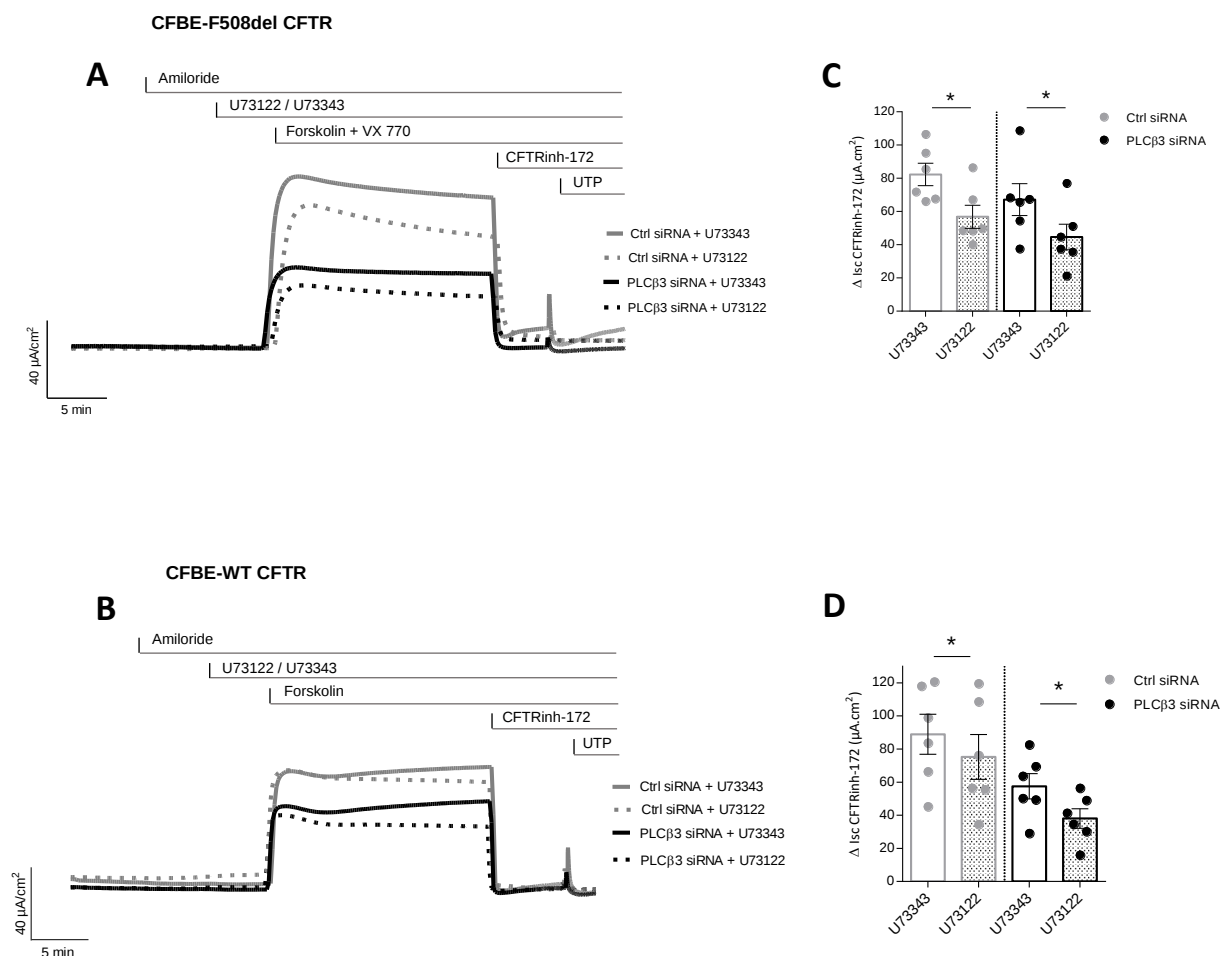


Figure 5: Phospholipase C inhibition decreases WT- and temperature corrected F508del CFTR-dependent short-circuit current of PLC β 3 siRNA transfected CFBE. A and B: time course of short-circuit current (I_{sc}) obtained in polarized bronchial epithelial CF cells with PLC β 3 siRNA or control siRNA in the presence of PLC inhibitor (U73122, 3 μ M) or its inactive analogue (U73343, 3 μ M) when stimulated by forskolin 10 μ M + VX770 1 μ M for CFBE-F508del cells (A) or forskolin 10 μ M for CFBE-WT cells (B). **C and D:** corresponding bar graphs of ΔI_{sc} CFTRinh-172 CFTR for CFBE-F508del cells (C) and for CFBE-WT cells (D). Mean $\pm$ SEM Wilcoxon paired test, p-value for CFBE-F508del and CFBE-WT: 0.0313.

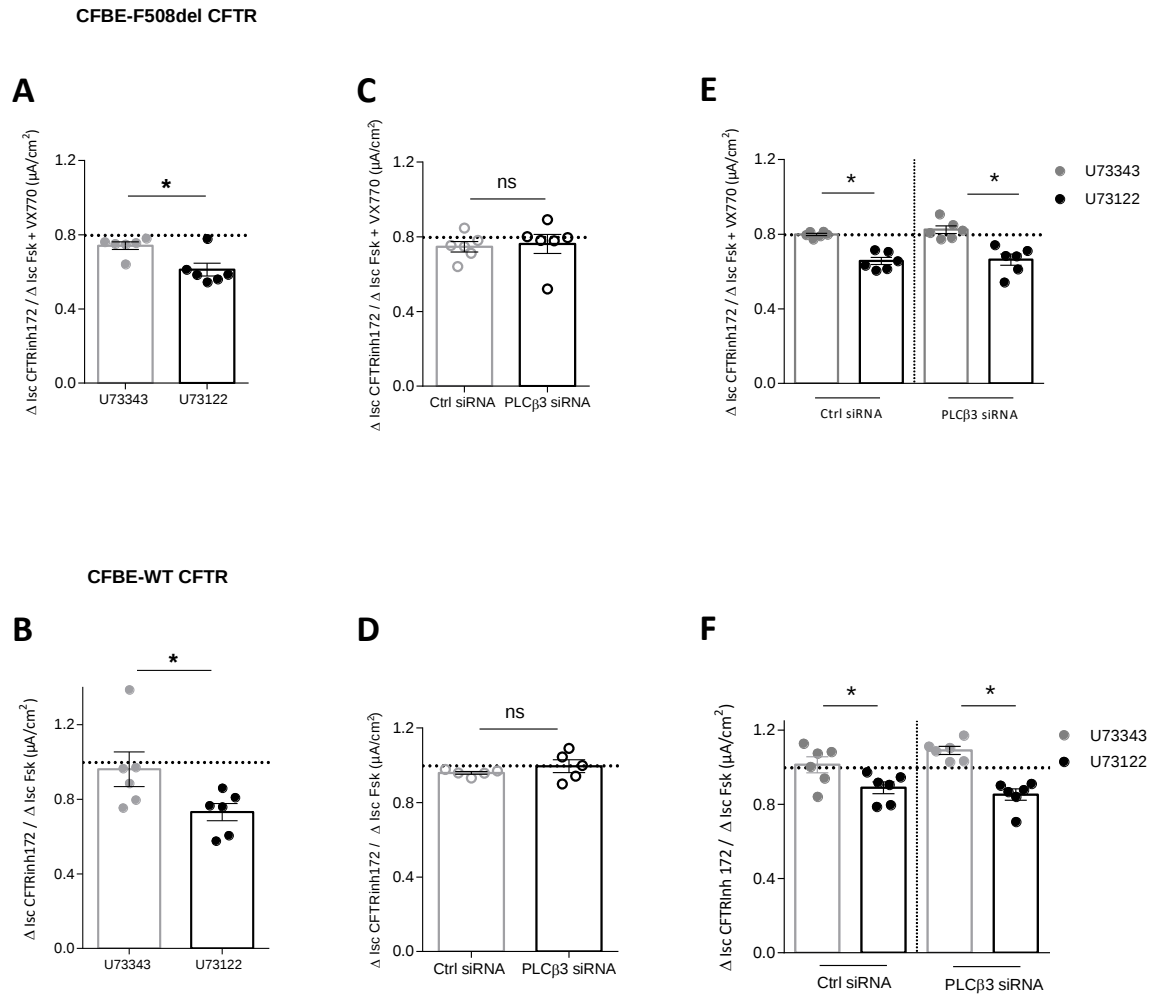


Figure 6: Phospholipase C inhibition decreases WT- and temperature corrected F508del- CFTR-dependent short-circuit current over time in non-transfected or PLCβ3 siRNA transfected CFBE cells after forskolin stimulation. $\Delta \text{Isc CFTRinh-172}$ to $\Delta \text{Isc Forskolin} \pm \text{VX770}$ ratio of experiments in Fig. 1, 4 and 5 was measured; since it represents CFTR-dependent short-circuit current stability over time, in WT- and F508del- CFBE expressing cells. **A** and **B**: $\Delta \text{Isc CFTRinh-172}$ to $\Delta \text{Isc Forskolin} \pm \text{VX770}$ ratio was measured in the presence of the PLC inhibitor (U73122, 3 μM) or its inactive analogue (U73343, 3 μM). Mean $\pm$ SEM Wilcoxon paired test, p-value for CFBE-F508del and CFBE-WT: 0.0313. **C** and **D**: $\Delta \text{Isc CFTRinh-172}$ to $\Delta \text{Isc Forskolin} \pm \text{VX770}$ ratio was measured for PLCβ3 siRNA transfected cells or control siRNA transfected cells. Mean $\pm$ SEM Wilcoxon paired test, p-value for CFBE-F508del: 0.5625 and CFBE-WT: 0.3125. **E** and **F**: $\Delta \text{Isc CFTRinh-172}$ to $\Delta \text{Isc Forskolin} \pm \text{VX770}$ ratio was measured in the presence of the PLC inhibitor (U73122, 3 μM) or its inactive analogue (U73343, 3 μM) for each PLCβ3 siRNA transfected cells and control siRNA transfected cells. Mean $\pm$ SEM Wilcoxon paired test, p-value for CFBE-F508del and CFBE-WT: 0.0313.

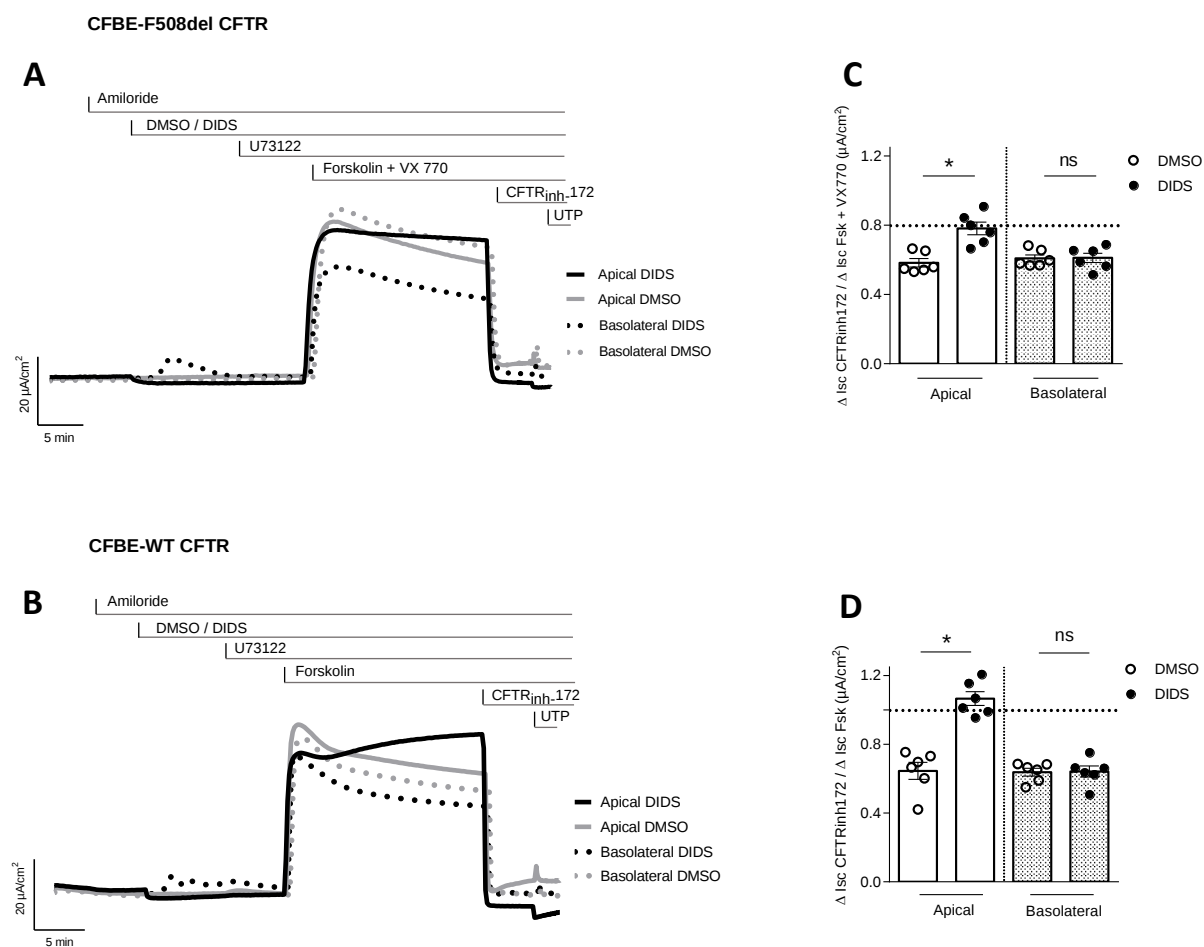


Figure 7: Treatment with DIDS in the apical solution, but not in the basolateral solution of Ussing chambers, abolishes the effect of U73122 in WT- and temperature corrected F508del- CFTR cells. A and B: time course of short-circuit current (I_{sc}) of polarized bronchial epithelial CF cells in the presence of DIDS or control (DMSO) before the addition of U73122 and CFTR activation by forskolin 10 μ M + VX770 1 μ M for CFBE-F508del cells (**A**) or forskolin 10 μ M for CFBE-WT cells (**B**). **C and D:** respective bar graphs of ΔI_{sc} CFTRinh-172 to ΔI_{sc} Forskolin $\pm$ VX770 ratio for corrected CFBE-F508del (**C**) and CFBE-WT (**D**). Mean $\pm$ SEM Wilcoxon paired test, p-value for CFBE-F508del and CFBE-WT with addition of DIDS in apical chambers: 0.0313; p-value for CFBE-F508del and CFBE-WT with addition of DIDS in basolateral chambers: > 0.9999.

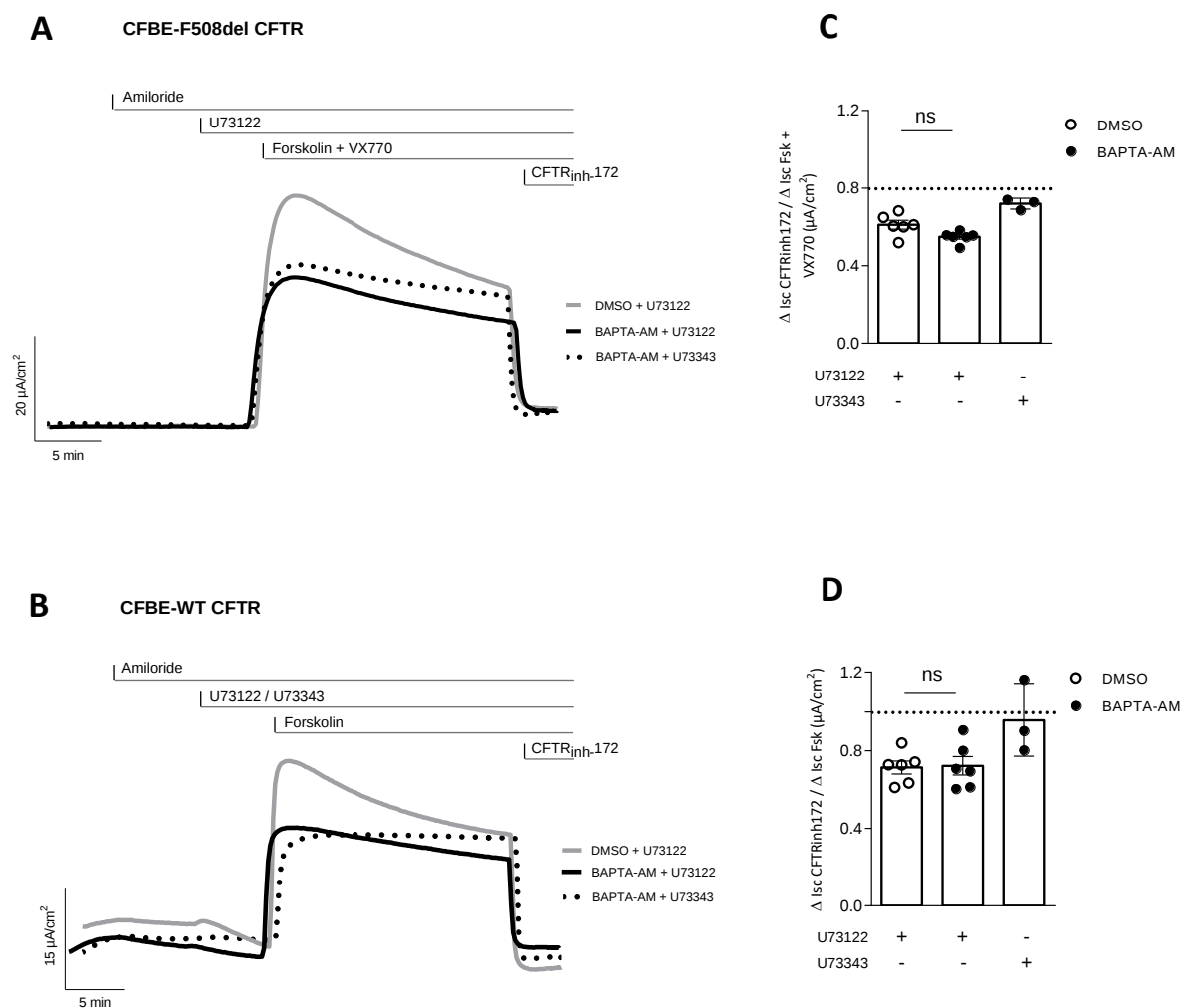


Figure 8: Pre-treatment with BAPTA-AM does not abolish the effect of U73122 in WT- and temperature corrected F508del- CFTR CFBE cells. A and B: time course of short-circuit current (I_{sc}) of CFBE cells pre-treated with BAPTA-AM (50 μ M) or control (DMSO) for 30 min before experiments. In all experiments, U73122 was added before CFTR activation by forskolin 10 μ M + VX770 1 μ M for CFBE-F508del cells (**A**) or forskolin 10 μ M for CFBE-WT cells (**B**) in order to record the slope over time. **C and D:** respective bar graphs of ΔI_{sc} CFTRinh-172 to ΔI_{sc} Forskolin $\pm$ VX770 ratio for corrected CFBE-F508del (**C**) and CFBE-WT (**D**). Mean $\pm$ SEM Wilcoxon paired test, p-value for CFBE-F508del: 0.1563 and p-value for CFBE-WT: 0.4375.

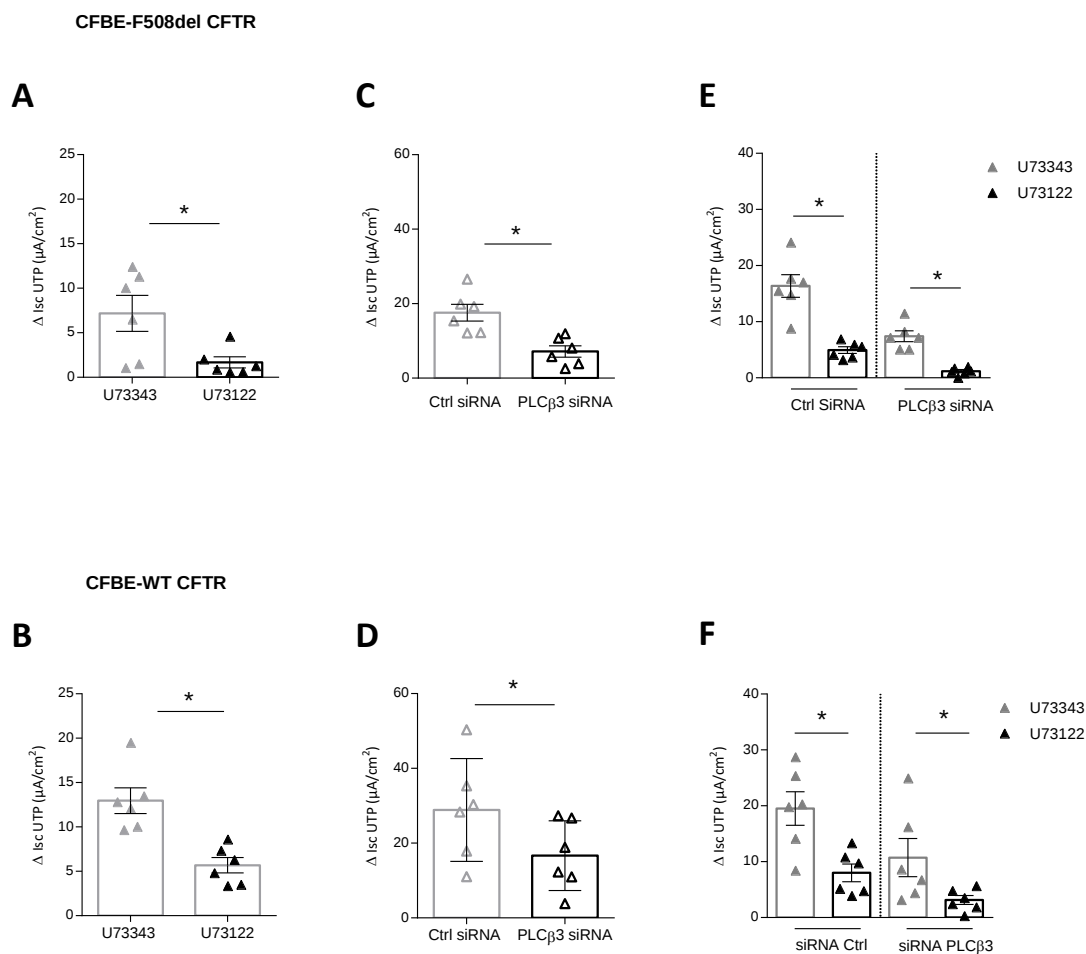


Figure 9: Phospholipase C inhibition and PLCβ3 silencing decrease CaCC activation by UTP in CFBE-WT CFTR and temperature corrected CFBE-F508del CFTR. UTP (100 μM) was added at the end of all experiments previously described in order to measure PLC involvement in CaCC activation. **A** and **B**: $\Delta I_{sc} UTP$ was measured in the presence of the PLC inhibitor (U73122, 3 μM) or its inactive analogue (U73343, 3 μM) in CFBE-F508del (**A**) or CFBE-WT (**B**). **C** and **D**: $\Delta I_{sc} UTP$ was measured in CFBE-F508del (**C**) and CFBE-WT (**D**) cells transfected with PLCβ3 or control siRNA. **E** and **F**: $\Delta I_{sc} UTP$ was measured for PLCβ3 siRNA transfected cells or control siRNA transfected cells in the presence of the PLC inhibitor (U73122, 3 μM) or its inactive analogue (U73343, 3 μM) in CFBE-F508del (**E**) and CFBE-WT (**F**). Mean $\pm$ SEM Wilcoxon paired test, p-value for CFBE-F508del and CFBE-WT: 0.0313.

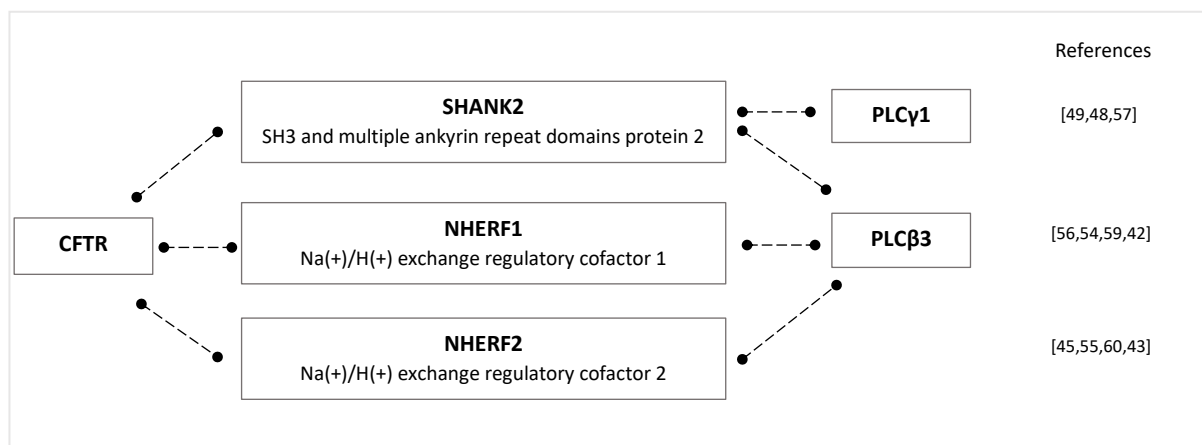


Figure 10: Common partners, identified in literature, between CFTR and PLC support the involvement of PLC in CFTR-dependent short-circuit current.

Bibliography:

- [1] L. Csanády, P. Vergani, and D. C. Gadsby, 'Structure, Gating, and Regulation of the CFTR Anion Channel', *Physiological Reviews*, vol. 99, no. 1, pp. 707–738, Jan. 2019.
- [2] J. R. Riordan, 'CFTR function and prospects for therapy', *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 77, pp. 701–726, 2008.
- [3] A. Billet, Y. Jia, T. Jensen, J. R. Riordan, and J. W. Hanrahan, 'Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator anion channel by tyrosine phosphorylation', *FASEB J.*, vol. 29, no. 9, pp. 3945–3953, Sep. 2015.
- [4] D. Dahan et al., 'Regulation of the CFTR channel by phosphorylation', *Pflugers Arch.*, vol. 443 Suppl 1, pp. S92–96, 2001.
- [5] D. C. Gadsby and A. C. Nairn, 'Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis', *Physiol. Rev.*, vol. 79, no. 1 Suppl, pp. S77–S107, Jan. 1999.
- [6] Y. Jia, C. J. Mathews, and J. W. Hanrahan, 'Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A', *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 8, pp. 4978–4984, Feb. 1997.
- [7] G. Seavilleklein et al., 'PKC phosphorylation modulates PKA-dependent binding of the R domain to other domains of CFTR', *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, vol. 295, no. 5, pp. C1366–1375, Nov. 2008.
- [8] A. Billet and J. W. Hanrahan, 'The secret life of CFTR as a calcium-activated chloride channel', *J. Physiol. (Lond.)*, vol. 591, no. 21, pp. 5273–5278, Nov. 2013.
- [9] Z. Bozoky et al., 'Synergy of cAMP and calcium signaling pathways in CFTR regulation', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 114, no. 11, pp. E2086–E2095, 14 2017.
- [10] Y. Nakamura and K. Fukami, 'Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C', *J. Biochem.*, Jan. 2017.
- [11] G. Kadamur and E. M. Ross, 'Mammalian phospholipase C', *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 75, pp. 127–154, 2013.
- [12] M. Schmidt et al., 'A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase', *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, no. 11, pp. 1020–1024, Nov. 2001.
- [13] J. Lérias et al., 'Compartmentalized crosstalk of CFTR and TMEM16A (ANO1) through EPAC1 and ADCY1', *Cell. Signal.*, vol. 44, pp. 10–19, Apr. 2018.
- [14] P. Ivonnet, M. Salathe, and G. E. Conner, 'Hydrogen peroxide stimulation of CFTR reveals an Epac-mediated, soluble AC-dependent cAMP amplification pathway common to GPCR signalling', *Br. J. Pharmacol.*, vol. 172, no. 1, pp. 173–184, Jan. 2015.
- [15] J. C. Domingue, M. Ao, J. Sarathy, and M. C. Rao, 'Chenodeoxycholic acid requires activation of EGFR, EPAC, and Ca²⁺ to stimulate CFTR-dependent Cl⁻ secretion in human colonic T84 cells', *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, vol. 311, no. 5, pp. C777–C792, Nov. 2016.
- [16] G. M. Denning, M. P. Anderson, J. F. Amara, J. Marshall, A. E. Smith, and M. J. Welsh, 'Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive', *Nature*, vol. 358, no. 6389, pp. 761–764, Aug. 1992.
- [17] L. Froux, C. Coraux, E. Sage, and F. Becq, 'Short-term consequences of F508del-CFTR thermal instability on CFTR-dependent transepithelial currents in human airway epithelial cells', *In press*.

- [18] S. Ramachandran et al., 'Efficient delivery of RNA interference oligonucleotides to polarized airway epithelia in vitro', *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, vol. 305, no. 1, pp. L23-32, Jul. 2013.
- [19] L. Vachel, C. Norez, C. Jayle, F. Becq, and C. Vandebrouck, 'The low PLC- δ 1 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells induces upregulation of TRPV6 channel activity', *Cell Calcium*, vol. 57, no. 1, pp. 38-48, Jan. 2015.
- [20] R. Xu, Q. Li, X.-D. Zhou, J. M. Perelman, and V. P. Kolosov, 'Oxidative stress mediates the disruption of airway epithelial tight junctions through a TRPM2-PLC γ 1-PKC α signaling pathway', *Int J Mol Sci*, vol. 14, no. 5, pp. 9475-9486, Apr. 2013.
- [21] V. Bezzerri et al., 'Phospholipase C- β 3 is a key modulator of IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells', *J. Immunol.*, vol. 186, no. 8, pp. 4946-4958, Apr. 2011.
- [22] B. Aravamudan and K. Broadie, 'Synaptic Drosophila UNC-13 is regulated by antagonistic G-protein pathways via a proteasome-dependent degradation mechanism', *J. Neurobiol.*, vol. 54, no. 3, pp. 417-438, Feb. 2003.
- [23] T. Jaunet-Lahary, A. Goupille, D. Jacquemin, F. Fleury, J. Graton, and A. D. Laurent, 'A Joint Theoretical and Experimental Study of the Behavior of the DIDS Inhibitor and its Derivatives', *Chemphyschem*, vol. 17, no. 15, pp. 2434-2445, Aug. 2016.
- [24] A. H. Rossi, W. C. Salmon, M. Chua, and C. W. Davis, 'Calcium signaling in human airway goblet cells following purinergic activation', *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, vol. 292, no. 1, pp. L92-98, Jan. 2007.
- [25] M. Rafehi and C. E. Müller, 'Tools and drugs for uracil nucleotide-activated P2Y receptors', *Pharmacol. Ther.*, vol. 190, pp. 24-80, 2018.
- [26] G. Burnstock, 'Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future', *Bioessays*, vol. 34, no. 3, pp. 218-225, Mar. 2012.
- [27] G. Magni and S. Ceruti, 'P2Y purinergic receptors: new targets for analgesic and antimigraine drugs', *Biochem. Pharmacol.*, vol. 85, no. 4, pp. 466-477, Feb. 2013.
- [28] K. M. Hoque et al., 'Epac1 mediates protein kinase A-independent mechanism of forskolin-activated intestinal chloride secretion', *J. Gen. Physiol.*, vol. 135, no. 1, pp. 43-58, Jan. 2010.
- [29] W. Namkung, W. E. Finkbeiner, and A. S. Verkman, 'CFTR-adenylyl cyclase I association responsible for UTP activation of CFTR in well-differentiated primary human bronchial cell cultures', *Mol. Biol. Cell*, vol. 21, no. 15, pp. 2639-2648, Aug. 2010.
- [30] A. J. Szkotak, S. F. P. Man, and M. Duszyk, 'The role of the basolateral outwardly rectifying chloride channel in human airway epithelial anion secretion', *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 29, no. 6, pp. 710-720, Dec. 2003.
- [31] C. A. Bertrand, R. Zhang, J. M. Pilewski, and R. A. Frizzell, 'SLC26A9 is a constitutively active, CFTR-regulated anion conductance in human bronchial epithelia', *J. Gen. Physiol.*, vol. 133, no. 4, pp. 421-438, Apr. 2009.
- [32] J. J. Salomon, S. Spahn, X. Wang, J. Füllekrug, C. A. Bertrand, and M. A. Mall, 'Generation and functional characterization of epithelial cells with stable expression of SLC26A9 Cl⁻ channels', *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, vol. 310, no. 7, pp. L593-602, 01 2016.
- [33] Y. D. Yang et al., 'TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance', *Nature*, vol. 455, no. 7217, pp. 1210-1215, Oct. 2008.
- [34] P. Scudieri et al., 'Association of TMEM16A chloride channel overexpression with airway goblet cell metaplasia', *J. Physiol. (Lond.)*, vol. 590, no. 23, pp. 6141-6155, Dec. 2012.

-
- [35] R. Toczyłowska-Mamińska and K. Dołowy, 'Ion transporting proteins of human bronchial epithelium', *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 113, no. 2, pp. 426–432, Feb. 2012.
 - [36] C. A. Bertrand et al., 'The CFTR trafficking mutation F508del inhibits the constitutive activity of SLC26A9', *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, vol. 312, no. 6, pp. L912–L925, 01 2017.
 - [37] L. Cocco, M. Y. Follo, L. Manzoli, and P.-G. Suh, 'Phosphoinositide-specific phospholipase C in health and disease', *J. Lipid Res.*, vol. 56, no. 10, pp. 1853–1860, Oct. 2015.
 - [38] A. Gresset, J. Sondek, and T. K. Harden, 'The phospholipase C isozymes and their regulation', *Subcell. Biochem.*, vol. 58, pp. 61–94, 2012.
 - [39] A. V. Smrcka, J. H. Brown, and G. G. Holz, 'Role of phospholipase C ϵ in physiological phosphoinositide signaling networks', *Cell. Signal.*, vol. 24, no. 6, pp. 1333–1343, Jun. 2012.
 - [40] J. K. Kim et al., 'Subtype-specific roles of phospholipase C- β via differential interactions with PDZ domain proteins', *Adv. Enzyme Regul.*, vol. 51, no. 1, pp. 138–151, 2011.
 - [41] V. Raghuram, D. O. Mak, and J. K. Foskett, 'Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 98, no. 3, pp. 1300–1305, Jan. 2001.
 - [42] Y. Jiang et al., 'Crystallographic analysis of NHERF1-PLC β 3 interaction provides structural basis for CXCR2 signaling in pancreatic cancer', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 446, no. 2, pp. 638–643, Apr. 2014.
 - [43] Y.-S. Oh et al., 'NHERF2 specifically interacts with LPA2 receptor and defines the specificity and efficiency of receptor-mediated phospholipase C-beta3 activation', *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 11, pp. 5069–5079, Jun. 2004.
 - [44] K. Arora et al., 'Stabilizing rescued surface-localized δ f508 CFTR by potentiation of its interaction with Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 1', *Biochemistry*, vol. 53, no. 25, pp. 4169–4179, Jul. 2014.
 - [45] W. Zhang, Z. Zhang, Y. Zhang, and A. P. Naren, 'CFTR-NHERF2-LPA₂ Complex in the Airway and Gut Epithelia', *Int J Mol Sci*, vol. 18, no. 9, Sep. 2017.
 - [46] N. Sharma et al., 'A sequence upstream of canonical PDZ-binding motif within CFTR COOH-terminus enhances NHERF1 interaction', *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, vol. 311, no. 6, pp. L1170–L1182, Dec. 2016.
 - [47] D. Broadbent et al., 'Roles of NHERF Family of PDZ-Binding Proteins in Regulating GPCR Functions', *Adv. Immunol.*, vol. 136, pp. 353–385, 2017.
 - [48] J. Y. Kim et al., 'Inhibitory regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator anion-transporting activities by Shank2', *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 11, pp. 10389–10396, Mar. 2004.
 - [49] J. H. Lee et al., 'Dynamic regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by competitive interactions of molecular adaptors', *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 14, pp. 10414–10422, Apr. 2007.
 - [50] S. Yamamoto, K. Ichishima, and T. Ehara, 'Regulation of extracellular UTP-activated Cl⁻ current by P2Y-PLC-PKC signaling and ATP hydrolysis in mouse ventricular myocytes', *J Physiol Sci*, vol. 57, no. 2, pp. 85–94, Apr. 2007.
 - [51] S. G. Rhee, 'Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C', *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 70, pp. 281–312, 2001.
 - [52] H. Zhu et al., 'Rescue of defective pancreatic secretion in cystic-fibrosis cells by suppression of a novel isoform of phospholipase C', *Lancet*, vol. 362, no. 9401, pp. 2059–2065, Dec. 2003.

-
- [53] A. Rimessi et al., 'PLCB3 Loss of Function Reduces *Pseudomonas aeruginosa*-Dependent IL-8 Release in Cystic Fibrosis', *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 59, no. 4, pp. 428–436, 2018.
- [54] J. I. Hwang et al., 'Regulation of phospholipase C-beta 3 activity by Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2', *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 22, pp. 16632–16637, Jun. 2000.
- [55] D. Reczek and A. Bretscher, 'Identification of EPI64, a TBC/rabGAP domain-containing microvillar protein that binds to the first PDZ domain of EBP50 and E3KARP', *J. Cell Biol.*, vol. 153, no. 1, pp. 191–206, Apr. 2001.
- [56] C. Wu et al., 'Systematic identification of SH3 domain-mediated human protein-protein interactions by peptide array target screening', *Proteomics*, vol. 7, no. 11, pp. 1775–1785, Jun. 2007.
- [57] J.-I. Hwang, H. S. Kim, J. R. Lee, E. Kim, S. H. Ryu, and P.-G. Suh, 'The interaction of phospholipase C-beta3 with Shank2 regulates mGluR-mediated calcium signal', *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 13, pp. 12467–12473, Apr. 2005.
- [58] R. A. Hall et al., 'A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 95, no. 15, pp. 8496–8501, Jul. 1998.
- [59] J. Holcomb et al., 'Structural insights into PDZ-mediated interaction of NHERF2 and LPA(2), a cellular event implicated in CFTR channel regulation', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 446, no. 1, pp. 399–403, Mar. 2014.
- [60] M. J. Lobo, M. D. Amaral, M. Zaccolo, and C. M. Farinha, 'EPAC1 activation by cAMP stabilizes CFTR at the membrane by promoting its interaction with NHERF1', *J. Cell. Sci.*, vol. 129, no. 13, pp. 2599–2612, 01 2016.

D. Résultats complémentaires

1. Effet de l'inhibition pharmacologique des PLC après l'activation forskoline sur le courant CFTR-dépendant

Lorsque les PLC sont inhibées par l'inhibiteur U73122 avant la stimulation forskoline, nous observons une diminution du courant CFTR dans le temps. Nous avons également testé l'effet de l'inhibition pharmacologique des PLC après une stimulation forskoline dans les cellules 16HBE14o-, CFBE-WT, et les cellules CFBE-F508del corrigées par la température (**Figure 27 A-C et E**). Nous observons le même effet que celui observé lorsque les cellules subissent un prétraitement avec le composé U73122 avant l'activation forskoline, à savoir que le pourcentage d'inhibition du courant CFTR-dépendant est significativement plus important en présence de l'inhibiteur U73122 par rapport à l'analogue inactif dans les trois lignées. Nous remarquons que le courant activé par la forskoline dans les CFBE-F508del corrigées diminue en fonction du temps, et cela même en absence du composé U73122. Nous pouvons expliquer cette chute de courant par le fait que les expériences ont été réalisées à 37°C, température à laquelle la protéine CFTR-F508del, une fois activée, n'est pas stable à la membrane (Froux et al., 2019).

En guise de contrôle, la même expérience a été réalisée sur des cellules CFBE-F508del non corrigées (**Figure 27 E**) dans lesquelles la stimulation forskoline est extrêmement faible tout comme la chute de courant entraînée par l'inhibiteur U73122. Ces expériences confirment l'implication des PLC dans le courant chlorure dépendant de la fonction du canal CFTR à la membrane.

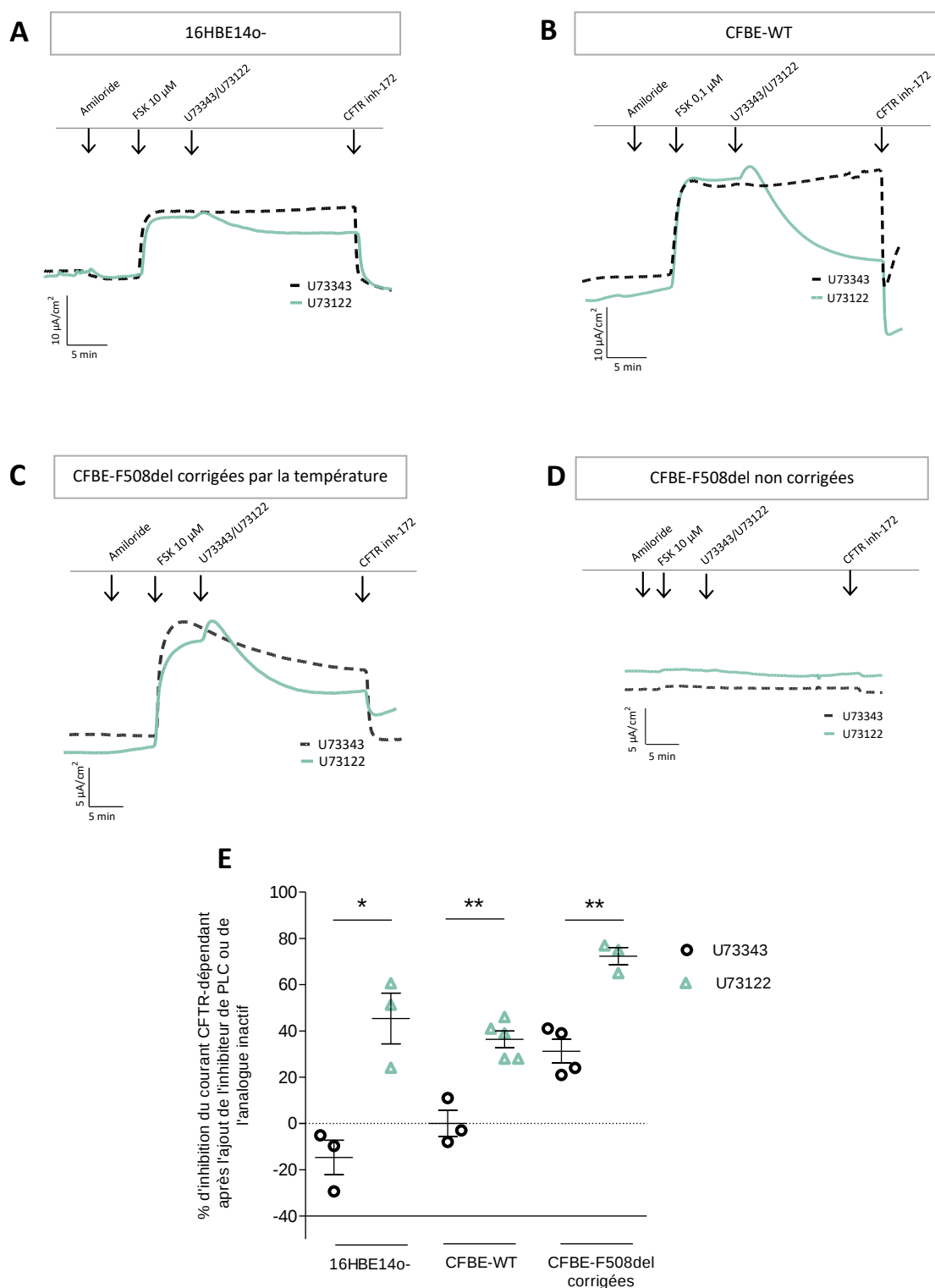


Figure 27 : Courant de court-circuit dépendant de l'activation du CFTR dans les lignées 16HBE14o-, CFBE-WT et CFBE-F508del en présence de l'inhibiteur de PLC U73122 ou de son analogue inactif.

A, B, C et D : courant de court-circuit après activation par 10 μ M ou 0,1 μ M de forskoline suivie de l'ajout de l'inhibiteur des PLC U73122 (3 μ M) ou de son analogue inactif U73343 (3 μ M) dans les cellules 16HBE14o- (**A**), CFBE-WT (**B**), CFBE-F508del corrigées par la température (**C**) ou dans les cellules CFBE-F508del non corrigées (**D**). **E :** histogramme représentant le pourcentage d'inhibition du courant CFTR-dépendant après ajout des molécules U73122 ou U73343 par rapport à l'inhibition obtenue avec le CFTRinh-172 pour les cellules 16HBE14o-, CFBE-WT et CFBE-F508del-CFTR. T-test non apparié, * p = 0,0106, ** p = 0,0012 pour les cellules CFBE-WT et ** p = 0,0018 pour les cellules CFBE-F508del.

2. Effet du DIDS sur le courant CFTR-dépendant dans les cellules CFBE-WT transfectées avec le siRNA PLC β 3

Nous avons observé qu'un canal chlorure, autre que CFTR, participait au courant CFTR-dépendant par l'intermédiaire des PLC. En effet, lorsque les PLC sont inhibées avec un agent pharmacologique, nous observons une chute du courant CFTR-dépendant au cours du temps. Pour les cellules transfectées avec le siRNA PLC β 3 nous n'observons pas ce phénomène, en revanche le courant CFTR-dépendant activé par la forskoline $\pm$ VX 770 est réduit par rapport à celui des cellules transfectées avec le siRNA contrôle. Autrement dit les PLC contribuent au courant CFTR-dépendant deux deux manières : elles favorisent l'activation du courant CFTR-dépendant par la forskoline et elles interviennent également dans le maintien du courant CFTR-dépendant au cours du temps après une activation par la forskoline. Nous avons rapidement vérifié si la diminution de l'activité du courant CFTR-dépendant observée par la transfection avec le siRNA PLC β 3 pouvait également être attribuée à l'action d'un canal chlorure autre que CFTR et qui serait potentialisé par la PLC β 3. Pour cela nous avons regardé l'effet du DIDS, disposé du côté apical de la chambre de Ussing, dans des cellules CFBE-WT transfectées avec le siRNA PLC β 3 ou le siRNA contrôle (**Figure 28**).

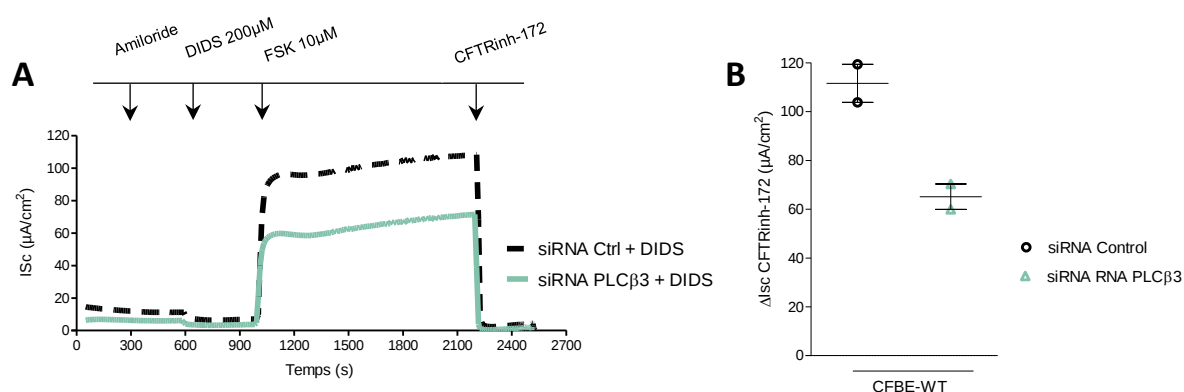


Figure 28 : Effet du DIDS sur le courant CFTR-dépendant dans des cellules CFBE-WT transfectées avec un siRNA PLC β 3

A : courant de court-circuit obtenu pour les cellules CFBE-WT transfectées avec le siRNA PLC β 3 ou le siRNA contrôle en présence de DIDS disposé du côté apical de la chambre de Ussing. **B** : histogramme représentant les $\Delta\text{ISC CFTRinh-172}$ pour les deux conditions, N=2.

Nous observons qu'en présence de DIDS nous avons toujours une différence d'activation du courant entre les CFBE-WT transfectées avec le siRNA PLC β 3 ($\Delta\text{ISC CFTRinh-172} = 65 \pm 5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) et le siRNA contrôle ($\Delta\text{ISC CFTRinh-172} = 112 \pm 8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Cette expérience semble montrer que la transfection par le siRNA PLC β 3 affecte une conductance chlorure dépendante de CFTR et non pas d'un autre canal chlorure.

3. Effet de l'inhibition des PKC sur le courant CFTR-dépendant dans les cellules CFBE-WT transfectées avec le siRNA PLC β 3

Il est admis que les PKC sont nécessaires pour obtenir une activation maximale du CFTR (Dahan et al., 2001; Jia et al., 1997; Seavilleklein et al., 2008). Comme les PLC, en produisant du DAG, favorisent l'activation des PKC, nous avons regardé si celles-ci étaient finalement responsables de la diminution de l'activation du courant CFTR-dépendant lorsque les cellules sont transfectées avec le siRNA PLC β 3 (**Figure 29**).

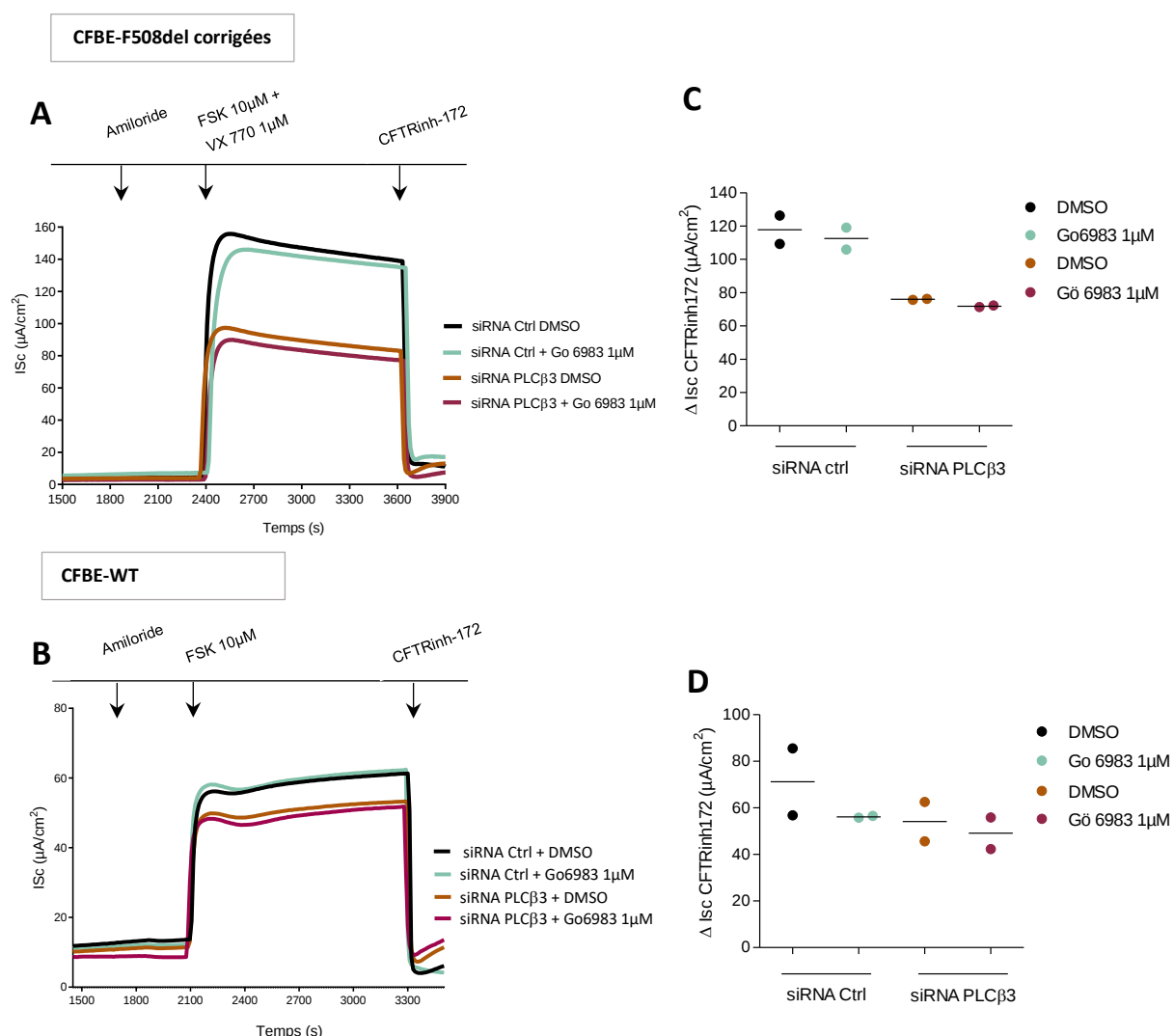


Figure 29 : Effet de l'inhibition des PKC sur les cellules CFBE-F508del corrigées et CFBE-WT, transfectées avec le siRNA PLC β 3

A et B : courant de court-circuit de cellules CFBE-F508del corrigées par la température (**A**) et de cellules CFBE-WT (**B**) transfectées soit avec le siRNA PLC β 3, soit avec le siRNA contrôle. Les cellules ont préalablement été traitées avec l'inhibiteur à spectre large des PKC Gö 6983 (1 μ M) ou avec le véhicule (DMSO) pendant 30 min, avant d'ajouter l'amiloride, de faire la stimulation forskoline $\pm$ VX 770, puis d'inhiber CFTR avec le CFTRinh-172. **B et C** : histogrammes représentant le Δ Isc CFTRinh-172 suite à l'inhibition des PKC sur les cellules transfectées avec le siRNA contrôle ou le siRNA PLC β 3 pour les cellules CFBE-F508del corrigées (**C**) ou CFBE-WT (**D**). N=2.

Nous constatons que les PKC participent effectivement au courant CFTR-dépendant dans les cellules CFBE-F508del corrigées et CFBE-WT, puisque nous avons une petite diminution de courant en présence de l'inhibiteur de PKC, le composé Gö6983, dans la condition siRNA contrôle (pour les CFBE-F508del, le ΔI_{sc} CFTRinh-172 = $117 \pm 9 \mu A/cm^2$ pour la condition DMSO *versus* $112 \pm 7 \mu A/cm^2$ pour la condition Gö6983 et pour les CFBE-WT, le ΔI_{sc} CFTRinh-172 = $71 \pm 14 \mu A/cm^2$ pour la condition DMSO *versus* $56 \pm 1 \mu A/cm^2$ pour la condition Gö6983). Pour la condition siRNA PLC β 3 nous observons une diminution similaire du courant CFTR-dépendant en présence de l'inhibiteur de PKC pour les deux lignées (pour les CFBE-F508del, le ΔI_{sc} CFTRinh-172 = $76 \pm 0,3 \mu A/cm^2$ pour la condition DMSO *versus* $72 \pm 0,5 \mu A/cm^2$ pour la condition Gö6983 et pour les CFBE-WT, le ΔI_{sc} CFTRinh-172 = $54 \pm 8 \mu A/cm^2$ pour la condition DMSO *versus* $49 \pm 6 \mu A/cm^2$ pour la condition Gö6983). Cette diminution de courant en présence de l'inhibiteur des PKC étant similaire dans les deux conditions (4 % pour la condition siRNA contrôle *versus* 5 % pour la condition siRNA PLC β 3 pour les CFBE-F508del et 20 % pour la condition siRNA contrôle *versus* 10 % pour la condition siRNA PLC β 3 pour les-WT), nous suggérons que l'effet du siRNA PLC β 3 n'est pas dû à une diminution de l'activité des PKC.

4. Essais de stimulation de la PLC β 3

La PLC β 3 s'avère essentielle pour optimiser la sécrétion d'ions chlorure dépendante de l'activité du canal CFTR. En outre, cette protéine joue sur l'activation du courant CFTR-dépendant mais aussi dans l'activation des CaCC. Dans le contexte de la mucoviscidose elle est donc bénéfique et il pourrait être intéressant de regarder l'effet d'une augmentation d'expression ou d'activité de cette protéine sur le courant CFTR-dépendant. Nous avons réalisé quelques essais dans ce sens, mais les résultats n'ont pas été très concluants et nous présenterons dans cette dernière partie des essais réalisés, parfois qu'une seule fois, mais qui retracent la démarche scientifique suivie.

i. Traitement par l'acétylshikonine (AS)

Une équipe chinoise a montré que des cellules de muscle squelettique de rat traitées pendant 2 h avec de l'acétylshikonine 1 μM permettait d'augmenter significativement l'expression de la PLC β 3 (Huang et al., 2019). Nous avons testé un traitement par l'acétylshikonine 1 μM pendant 2 h sur nos cellules, mais nous n'avons pas observé de répercussion sur le courant CFTR-dépendant. Nous avons alors essayé un traitement de 24h avec cette molécule à la concentration de 1 μM de cellules CFBE-WT transfectées avec le siRNA PLC β 3 et nous avons observé une augmentation du courant CFTR-dépendant activé par la forskoline similaire pour la condition siRNA PLC β 3 (28 % d'augmentation) et siRNA contrôle (41 % d'augmentation) (**Figure 30**). Nous avons vérifié l'efficacité de l'acétylshikonine sur l'expression de la PLC β 3 dans notre modèle par western blot. Cette expérience a révélé une

augmentation de l'expression de la PLC β 3 dans les cellules transfectées avec le siRNA contrôle mais pas dans les cellules transfectées avec le siRNA PLC β 3. Ce résultat suggère que l'acétylshikonine stimule le courant CFTR-dépendant par un mécanisme indépendant de la PLC β 3. Ainsi, le traitement par l'acétylshikonine induit une augmentation de courant chlorure dans les CFBE-WT, ce qui constitue en soi un résultat intéressant, néanmoins il semblerait que l'effet provoqué par cette molécule ne passe pas par la PLC β 3.

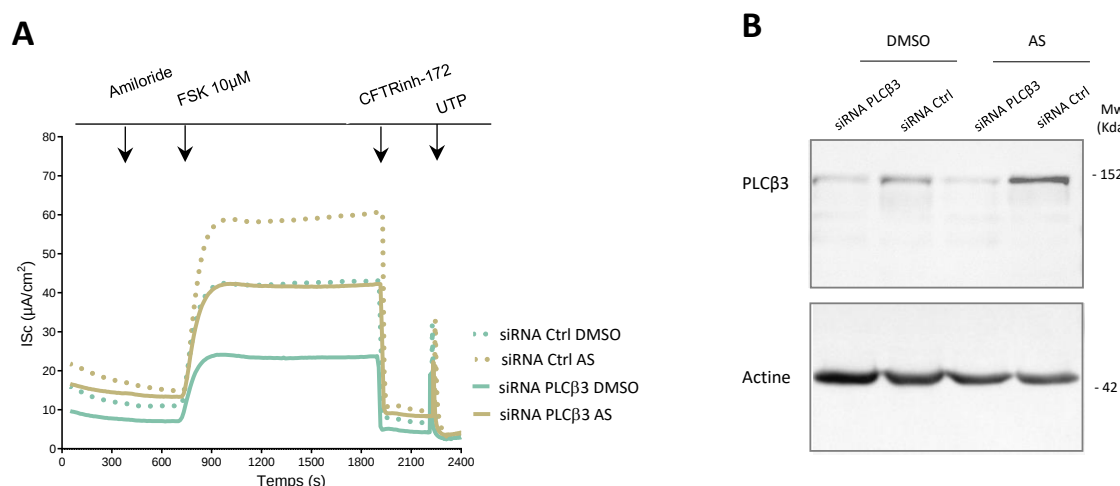


Figure 30 : Effet du traitement par l'acétylshikonine (AS) 1 μM pendant 24 h sur le courant CFTR-dépendant dans des cellules CFBE-WT

A : courant de court-circuit de cellules CFBE-WT traitées au préalable pendant 24 h avec de l'acétylshikonine 1 μM ou le véhicule (DMSO), puis stimulées avec de la forskoline 10 μM . **B** : western blot représentant l'expression de la PLC β 3 dans les cellules utilisées en A.

ii. Traitement par l'acide lysophosphatidique (LPA)

L'acide lysophosphatidique (LPA) est un ligand des récepteurs couplés aux protéines $G_{\alpha/11}$ et $G_{\alpha/o}$ qui activent trois voies de signalisation : la voie Rho, la voie PI3K et les PLC β . Nous avons testé son effet sur le courant CFTR-dépendant dans la lignée 16HBE14o- et nous avons observé une augmentation significative du courant CFTR-dépendant après traitement avec le LPA ($\Delta I_{sc} = 2,7 \pm 0,2 \mu A/cm^2$ pour le traitement PBS et $\Delta I_{sc} = 6,5 \pm 1,5 \mu A/cm^2$ pour le traitement LPA) (**Figure 31**). Cette expérience a ensuite été réalisée une fois dans des cellules 16HBE14o- transfectées cette fois-ci par le siRNA PLC β 3 ou le siRNA contrôle. Nous avons enregistré une augmentation de courant dans les deux conditions (4 $\mu A/cm^2$ pour la condition siRNA PLC β 3 et 13 $\mu A/cm^2$ pour la condition siRNA contrôle) par rapport au courant enregistré dans les cellules non traitées par du LPA où nous avons une moyenne de 2 $\mu A/cm^2$ pour la condition siRNA PLC β 3 et 3 $\mu A/cm^2$ pour la condition siRNA contrôle. Ce résultat montre que l'acide lysophosphatidique semble exercer un effet bénéfique sur le courant CFTR-dépendant dans la

lignée bronchique qui exprime la protéine CFTR-WT de façon endogène, et que cet effet pourrait être dû à l'activation de la PLC β 3. Pour des raisons de temps, cette piste n'a pas pu être vérifiée un plus grand nombre de fois mais nous pouvons garder en mémoire que le traitement par l'acide lysophosphatidique constitue peut-être une piste pour activer le courant chlorure CFTR-dépendant via une activation de la PLC β 3.

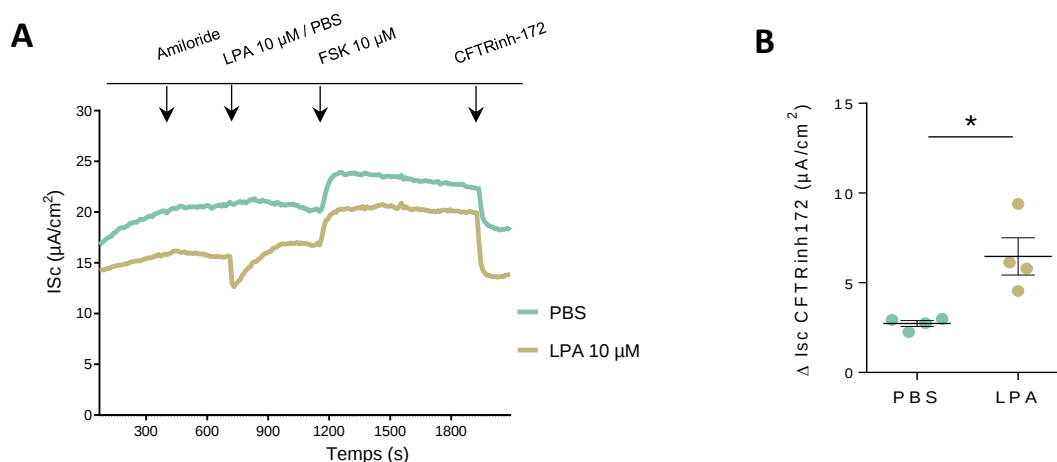


Figure 31 : Effet de l'acide lysophosphatidique (LPA) sur le courant CFTR-dépendant dans les 16HBE14o-

A : Courant de court-circuit de cellules 16HBE14o- traitées pas du LPA 10 μM ou par le véhicule (PBS), puis stimulées avec de la forskoline 10 μM . **B :** histogramme représentant le ΔIsc CFTRinh-172 pour la condition LPA et PBS. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM, t-test non apparié, * $p=0,0118$.

PARTIE II : Implication des PLC dans l'influx calcique des cellules bronchiques épithéliales non CF et CF

A. Contexte

Cette partie du projet s'appuie sur des travaux de l'équipe qui ont montré que la PLC δ 1 intervenait dans la régulation de l'influx calcique dans les cellules épithéliales bronchiques non CF (Vachel et al., 2015). En effet, des expériences d'interférence par ARN de la PLC δ 1 réalisées dans la lignée 16HBE14o- ainsi que dans des cellules humaines épithéliales bronchiques hAECB (Epithelix®) ont montré une augmentation significative du pic calcique, suite à une activation par le Ca²⁺, sur des cellules transfectées avec le siRNA PLC δ 1 par rapport aux mêmes cellules transfectées avec le siRNA contrôle.

Dans un premier temps nous avons étudié le rôle de la PLC δ 1 dans la régulation de l'influx calcique grâce à la technique d'interférence par ARN dans les cellules CFBE41o-, puis avec cette même technique, nous avons étudié l'implication de deux autres isoformes de PLC, la PLC γ 1 et la PLC β 3 dans la régulation de l'influx calcique dans les cellules humaines épithéliales bronchiques (hAECB) non CF et CF.

B. Résultats

1. Étude du rôle de la PLC δ 1 dans la régulation de l'influx calcique dans les cellules épithéliales bronchiques CF

Nous connaissons l'existence d'une régulation de l'entrée calcique du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire par la PLC δ 1 dans la lignée non CF 16HBE14o- ainsi que dans les cellules hAECB non CF (épithelix®), mais dans les cellules CF, cette régulation n'a pas encore été documentée. Étant donné que les régulations de l'homéostasie calcique dans les cellules CF sont perturbées dans le sens d'une augmentation globale de Ca²⁺ intracellulaire, nous avons étudié dans cette partie le rôle de la PLC δ 1 dans la régulation de l'influx calcique des cellules CF dans la lignée CFBE41o-.

i. Mesure de l'influx calcique dans les cellules CFBE41o- transfectées avec le siRNA PLC δ 1

Les cellules CFBE41o- ont été transfectées avec le siRNA PLC δ 1, la mesure de Ca²⁺ intracellulaire a été réalisée, puis les cellules ont été récupérées pour l'étude de l'expression protéique par western blot (**Figure 32**). L'influx calcique déclenché par le passage d'un milieu à 0 mM de Ca²⁺ à un milieu à 2,5 mM

de Ca^{2+} est estimé à 0,7 (a.u) pour les CFBE transfectées avec le siRNA contrôle et à 0,4 (a.u) pour les CFBE transfectées avec le siRNA PLC δ 1. Il se trouve que dans les cellules CFBE410-, l'influx calcique ne semble pas être régulé de la même manière que dans les cellules 16HBE140- : dans les CFBE410- la diminution de l'expression de la PLC δ 1 entraîne une diminution de l'influx calcique, tandis que l'effet opposé est décrit pour les cellules 16HBE140-.

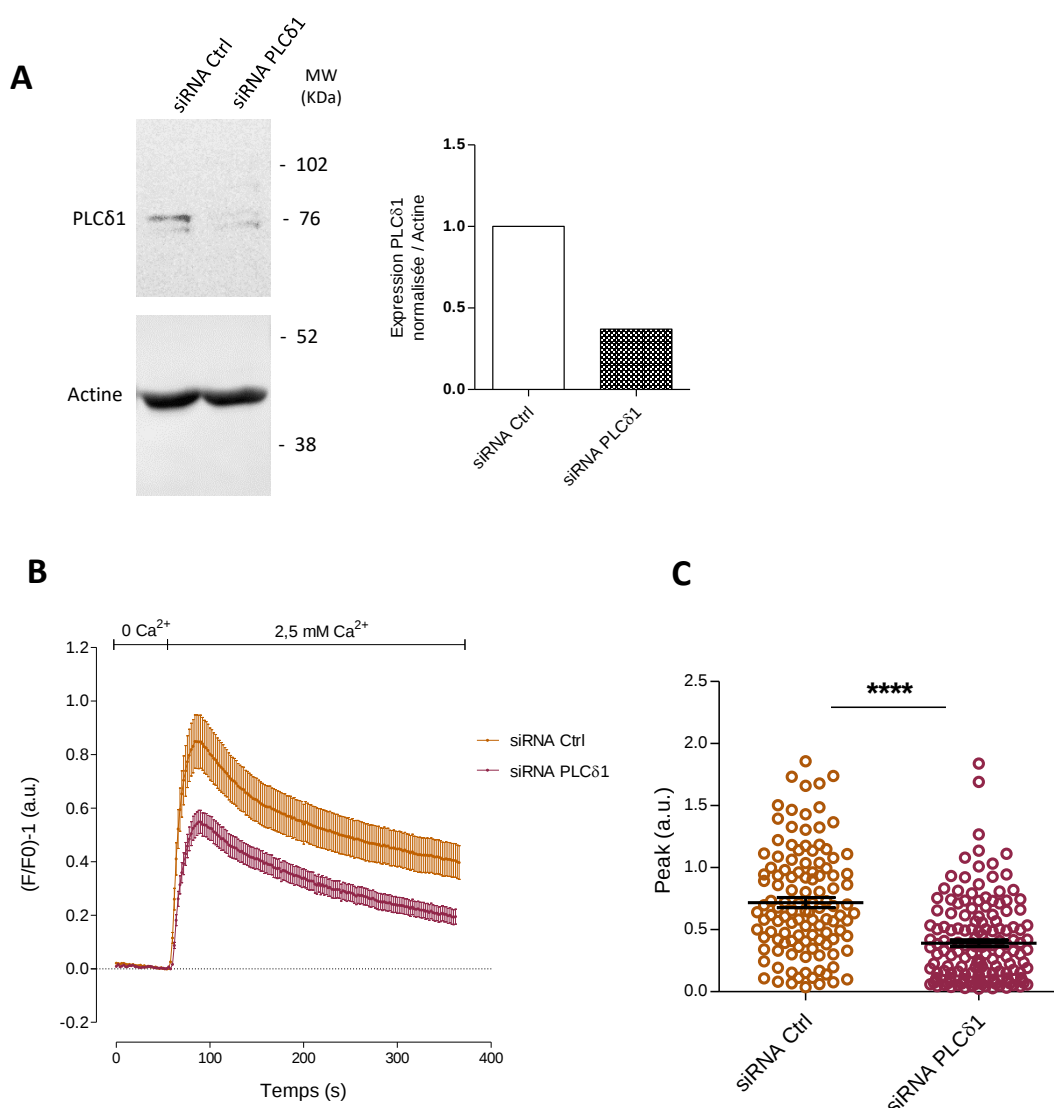


Figure 32 : Effet du siRNA PLC δ 1 sur l'influx calcique dans les cellules CFBE

(A) Western blot témoignant de l'efficacité de la transfection avec le siRNA PLC δ 1 par rapport au siRNA contrôle. La transfection avec le siRNA PLC δ 1 entraîne une diminution de moitié de l'expression de la protéine. (B) Courbes représentatives de la mobilisation calcique suite à l'activation par une solution à 2,5 mM de Ca²⁺ pour les CFBE410- transfectées avec le siRNA contrôle (orange) ou le siRNA PLC δ 1 (pourpre). (C) Histogrammes représentant le pic calcique préfigurant d'une entrée de Ca²⁺ dans les cellules pour les CFBE410- transfectées avec le siRNA contrôle (orange) ou le siRNA PLC δ 1 (pourpre).

ii. *Mesure de l'influx calcique dans les cellules hAECB CF transfectées avec le siRNA PLC δ 1*

Dans le but de confirmer le rôle de la PLC δ 1 allant dans le sens d'une régulation positive de l'influx calcique des cellules pulmonaires CF, les mêmes expériences ont été réalisées dans les cellules hAECB issues de patients à P0 (**Figure 33 A et B**). Dans les cellules hAECB CF, nous observons la même tendance que précédemment, à savoir que lorsque ces cellules sont transfectées avec le siRNA PLC δ 1, l'influx calcique est plus faible par rapport à celui mesuré dans les cellules hAECB CF transfectées avec le siRNA contrôle. Nous avons également comparé, en guise de contrôle, l'influx calcique dans des cellules hAECB non CF transfectées avec le siRNA PLC δ 1 d'une part et avec le siRNA contrôle d'autre part (**Figure 33 C et D**). Nous observons que l'influx calcique déclenché par le passage d'un milieu à 0 mM de Ca²⁺ à un milieu à 2,5 mM de Ca²⁺ dans les cellules hAECB non CF transfectées avec le siRNA PLC δ 1 est plus élevé que l'influx mesuré dans les cellules hAECB non CF transfectées avec le siRNA contrôle, ce qui est en adéquation avec la littérature (Vachel et al., 2015). Nous nous trouvons donc dans un système de régulation de l'influx calcique qui est différent dans le contexte de la mucoviscidose par rapport au contexte non pathologique.

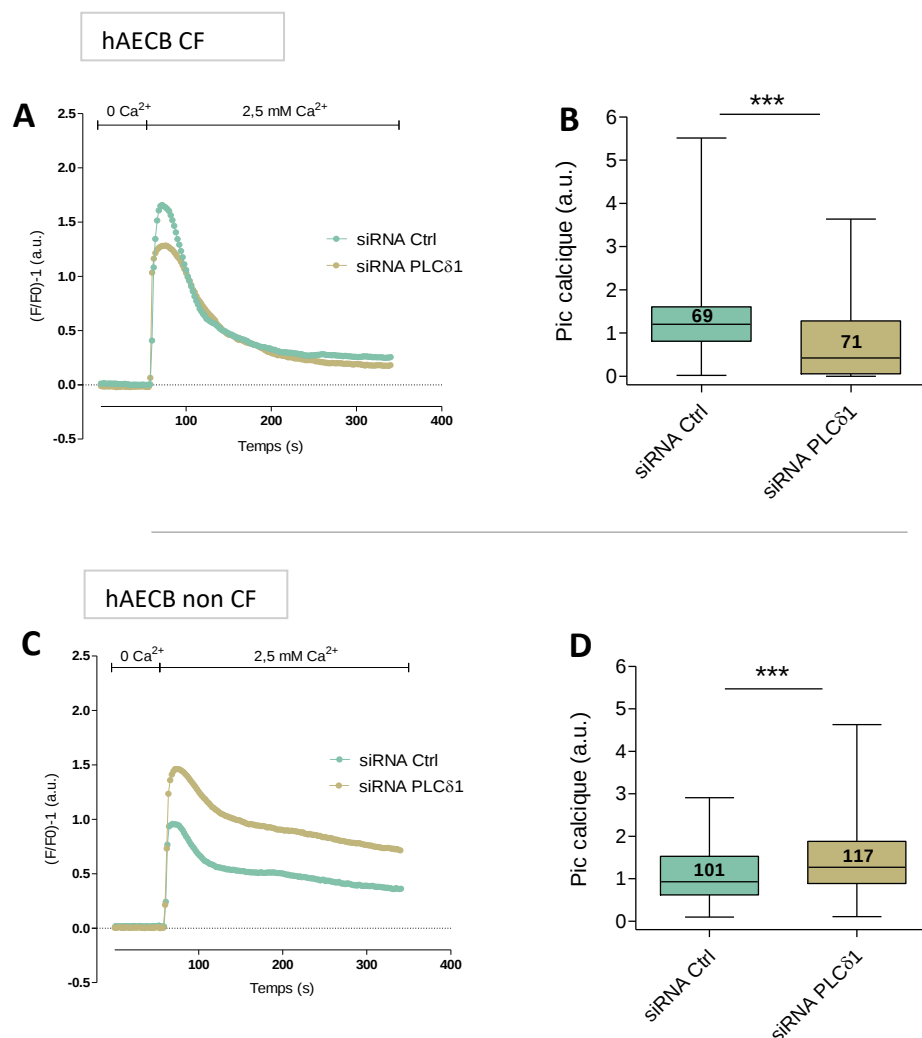


Figure 33 : Effet du siRNA PLC δ 1 sur l'influx calcique dans les cellules hAECB non CF et CF

(A) Courbes représentatives de l'influx calcique dans les cellules hAECB CF transfectées par le siRNA PLC δ 1 ou le siRNA contrôle (Ctrl) et (B) histogramme représentant le pic calcique suite à l'activation de 2,5 mM de Ca $^{2+}$ pour les deux conditions. (C) Courbes représentatives de l'influx calcique dans les cellules hAECB non CF transfectées avec le siRNA PLC δ 1 ou le siRNA contrôle (Ctrl) et (D) histogramme représentant le pic calcique suite à l'activation par 2,5 mM de Ca $^{2+}$ pour les deux conditions. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM. Mann-Whitney, pour les cellules hAECB CF, *** $p < 0,0001$ et pour les cellules hAECB CF, *** $p = 0,0006$.

2. Étude du rôle de la PLC γ 1 et de la PLC β 3 dans la régulation de l'influx calcique des cellules hAECB non CF et CF

Maintenant que nous avons remarqué que la PLC δ 1 régula négativement l'influx calcique dans une cellule non CF, et que cette régulation ne semble pas avoir lieu dans une cellule CF, nous avons étudié l'éventuelle implication de la PLC γ 1 et de la PLC β 3, dans la régulation de l'influx calcique dans les cellules hAECB non CF et hAECB CF.

La PLC γ 1 et la PLC β 3 ont été décrites comme étant exprimées dans les cellules pulmonaires (Bezzetti et al., 2011; Rimessi et al., 2018; Xu et al., 2013). Leur expression a été vérifiée dans les cellules hAECB non CF et CF au premier passage pour envisager les expériences d'interférence par ARN (**Figure 34**).

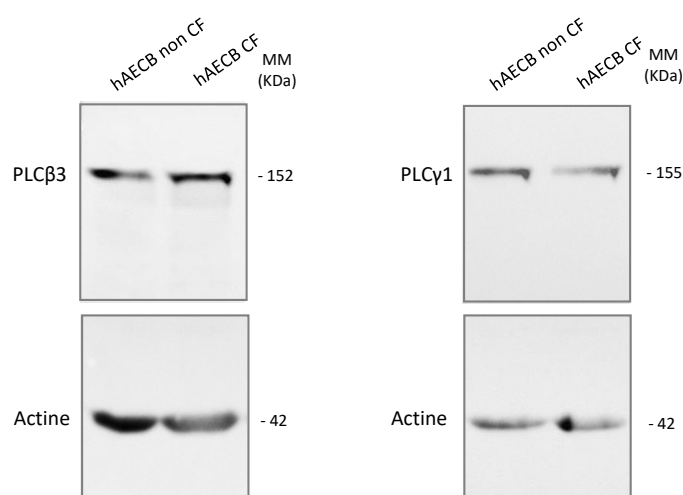


Figure 34 : Contrôle de l'expression de la PLC β 3 et de la PLC γ 1 dans les cellules hAECB non CF et CF au premier passage par western blot

i. Mesure de l'influx calcique dans les cellules hAECB non CF transfectées avec le siRNA PLC γ 1 et le siRNA PLC β 3

L'influx calcique induit par l'exposition d'une solution à 2,5 mM de Ca²⁺ dans les cellules hAECB non CF transfectées avec le siRNA PLC γ 1 est significativement diminué par rapport à l'influx observé dans ces mêmes cellules transfectées avec le siRNA contrôle (**Figure 35 A et B**). En revanche, l'influx calcique dans les cellules hAECB non CF transfectées avec le siRNA PLC β 3 est significativement plus important que celui enregistré dans les cellules hAECB non CF transfectées avec le siRNA contrôle (**Figure 35 C et D**). Nous constatons donc que la PLC β 3 semble également intervenir, au même titre que la PLC δ 1, dans la régulation négative de l'influx calcique des cellules épithéliales bronchiques non mucoviscidiques.

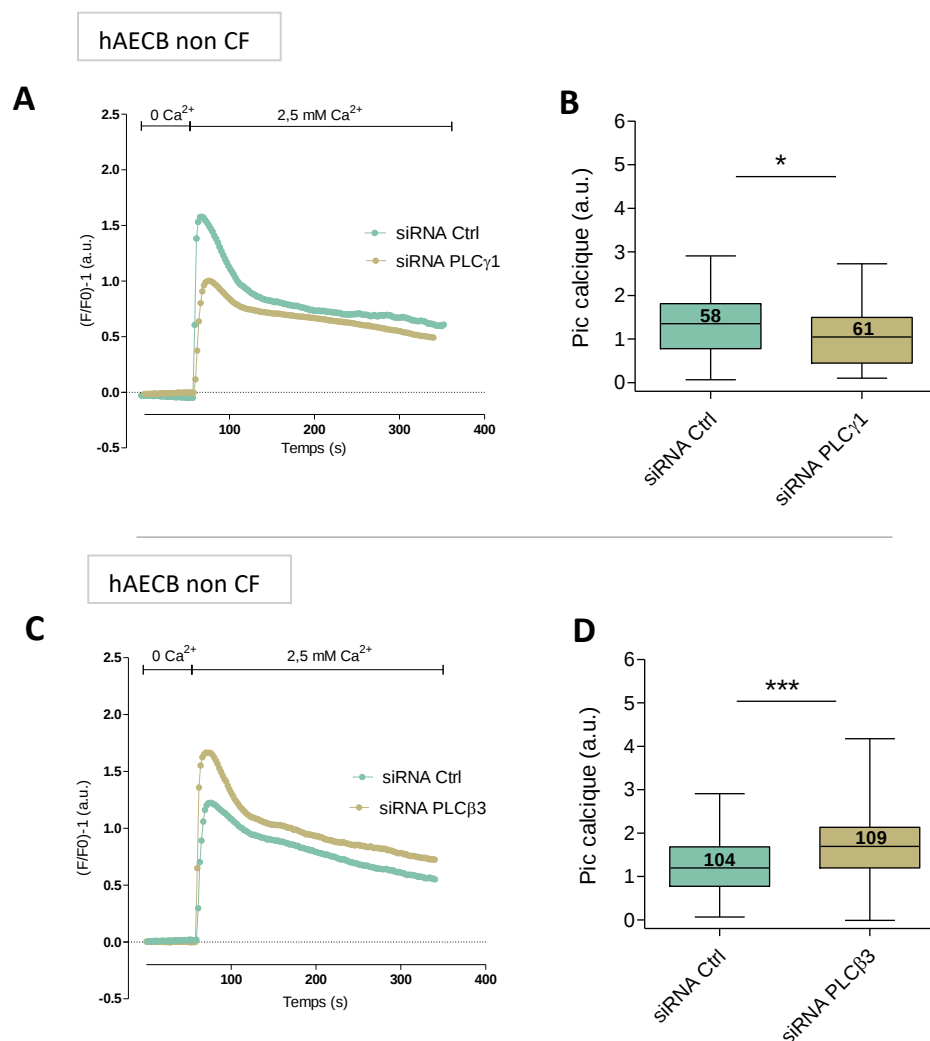


Figure 35 : Effet des siRNA PLC γ 1 et PLC β 3 sur l'influx calcique dans les cellules hAECB non CF

(A) Courbes représentatives de l'influx calcique dans les cellules hAECB non CF transfectées avec le siRNA PLC γ 1 ou le siRNA contrôle (Ctrl) et (B) histogramme représentant le pic calcique suite à l'activation par 2,5 mM de Ca²⁺ pour les deux conditions. (C) Courbes représentatives de l'influx calcique dans les cellules hAECB non CF transfectées avec le siRNA PLC β 3 ou le siRNA contrôle (Ctrl) et (D) histogramme représentant le pic calcique suite à l'activation par 2,5 mM de Ca²⁺ pour les deux conditions. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM. Mann-Whitney, *p=0,0495 et ***p<0,0001.

ii. Mesure de l'influx calcique dans les cellules hAECB CF transfectées avec le siRNA PLC γ 1 et le siRNA PLC β 3

Nous observons que le fait de transfecter les cellules hAECB CF avec le siRNA PLC γ 1 augmente significativement l'influx calcique par rapport aux mêmes cellules transfectées avec le contrôle (**Figure 36 A et B**). Par ailleurs le fait de transfecter ces mêmes cellules avec le siRNA PLC β 3 ne modifie pas significativement l'influx calcique dans les cellules hAECB CF par rapport aux cellules hAECB CF transfectées avec le siRNA contrôle (**Figure 36 C et D**). Ainsi ni la PLC γ 1, ni PLC β 3 ne semblent prendre part à la régulation négative de l'influx calcique des cellules épithéliales bronchiques mucoviscidosiques.

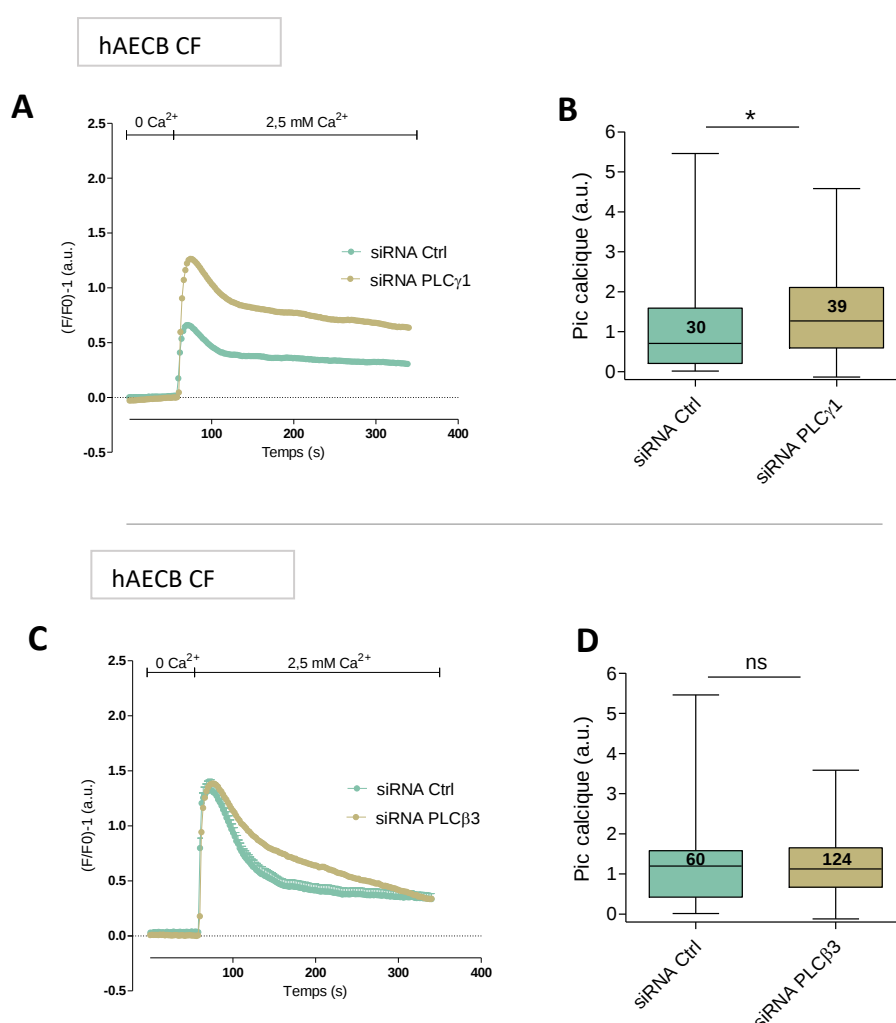


Figure 36 : Effet des siRNA PLC γ 1 et PLC β 3 sur l'influx calcique dans les cellules hAECB CF

(A) Courbes représentatives de l'influx calcique dans les cellules hAECB CF transfectées avec le siRNA PLC γ 1 ou le siRNA contrôle (Ctrl) et (B) histogramme représentant le pic calcique suite à l'activation par 2,5 mM de Ca $^{2+}$ pour les deux conditions. (C) Courbes représentatives de l'influx calcique dans les cellules hAECB CF transfectées avec le siRNA PLC β 3 ou le siRNA contrôle (Ctrl) et (D) histogramme représentant le pic calcique suite à l'activation par 2,5 mM de Ca $^{2+}$ pour les deux conditions. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM. Mann-Whitney, *p=0,0465 et ns = 0,6064.

3. Influx calcique dans les cellules hAECB non CF et CF : Résumé et conclusion

L'entrée de calcium du milieu extracellulaire vers le cytosol peut être attribuable aux canaux de la famille TRP. Dans nos expériences nous avons utilisé le Ca^{2+} pour activer l'influx calcique et nous n'avons pas utilisé de ligands spécifiques. Les canaux TRPV5 et TRPV6 sont constitutivement actifs, fortement perméables au Ca^{2+} (Gees et al., 2010), et exprimés dans les lignées 16HBE14o-, CFBE41o- ainsi que dans les cellules hAECB non CF et CF (Vachel et al., 2015). De plus, l'équipe a précédemment montré, par interférence par ARN et par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, que cet influx calcique était attribuable à TRPV5 mais surtout à TRPV6 qui, lorsqu'il est inhibé, permet de diminuer l'influx calcique de moitié (Vachel et al., 2015). Comme cela, pour la suite de l'étude, nous parlerons d'influx calcique médié par TRPV6.

Nous avons constaté que la régulation de l'influx calcique dans les cellules hAECB faisait intervenir les PLC mais cette régulation diffère en fonction du statut CF ou non CF (**Tableau 14**). En effet, dans les cellules hAECB non CF, la PLC δ 1 et la PLC β 3 semblent réguler négativement l'influx calcique alors que la PLC γ 1 semble, au contraire, réguler l'influx calcique positivement. Dans les cellules hAECB CF, la PLC δ 1 paraît, à l'inverse, réguler positivement l'influx calcique et la PLC γ 1 négativement, tandis que la PLC β 3 ne semble pas avoir de rôle dans cette régulation. Nous avons mis en évidence une différence de régulation de l'influx calcique faisant intervenir les phospholipases C dans les cellules pulmonaires CF par rapport aux cellules non CF. La quantification des isoformes de PLC, la localisation cellulaire ou encore la recherche de partenaires communs aux canaux TRPV6 et TRPV5 avec les différentes isoformes de PLC serait des paramètres intéressants à étudier pour expliquer ces différences de régulation dues à la mutation CFTR-F508del.

	hAECB non CF	hAECB CF
PLCδ1	Inhibition	Activation
PLCγ1	Activation	Inhibition
PLCβ3	Inhibition	Absence d'effet

Tableau 14 : Tableau récapitulatif du rôle exercé par les isoformes PLC δ 1, PLC γ 1 et PLC β 3 sur l'influx calcique dans les cellules hAECB non CF et hAECB CF

PARTIE III : Focus sur le rôle de la PLC δ 1 dans la régulation de l'influx calcique des cellules épithéliales bronchiques

A. Contexte

Il est un fait établi que le canal TRPV6 est négativement régulé par la PLC δ 1 dans les cellules HEK293 (Thyagarajan et al., 2008, 2009). Les travaux de notre équipe ont montré que le canal TRPV6 était, de la même façon, régulé négativement par la PLC δ 1 dans les cellules épithéliales bronchiques (Vachel et al., 2015). Nous avons observé que cette régulation ne semble pas avoir lieu dans les cellules épithéliales bronchiques CF où la PLC δ 1 participe au contraire à la régulation positive de l'influx calcique (**Figure 32** et **Figure 33**). La PLC δ 1 n'est pas le seul élément régulateur du canal TRPV6 : le PIP $_2$, phospholipide membranaire, est un activateur direct de TRPV6, au même titre que l'ATP en tant que substrat pour les kinases qui régénèrent le PIP $_2$ (Zakharian et al., 2011). Par ailleurs le complexe formé par les deux petites protéines annexine 2 et S100A10 régule à la fois TRPV6 (Borthwick et al., 2008b) et CFTR-WT (Borthwick et al., 2008a) de manière positive. L'enjeu dans cette partie a été d'établir des liens entre ces différents acteurs, qui pourraient expliquer pourquoi la régulation du canal TRPV6, faisant intervenir la PLC δ 1, est différente en présence de la mutation CFTR-F508del (**Figure 37**).

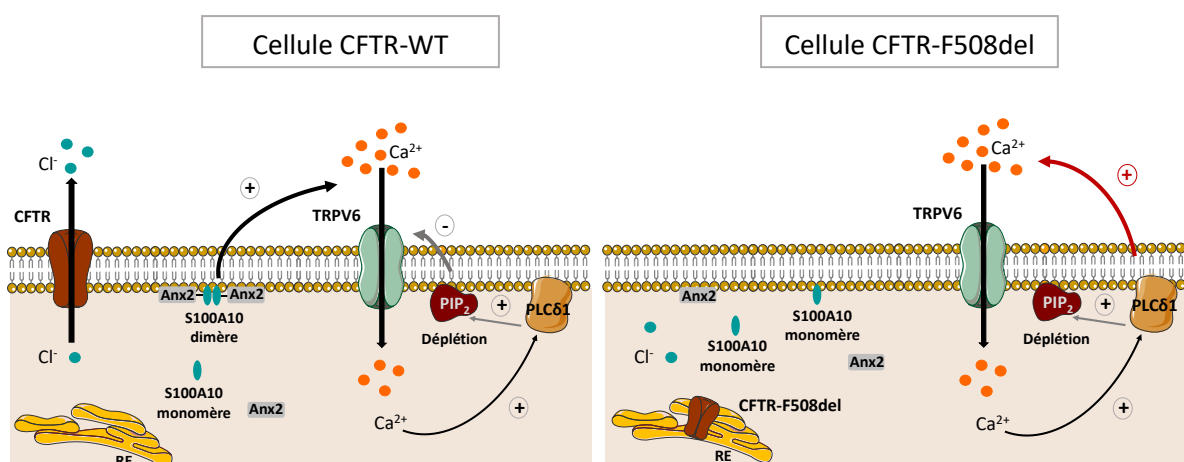


Figure 37 : Différences de régulation du canal TRPV6 impliquant la PLC δ 1 entre une cellule non CF et une cellule CF

Dans une cellule exprimant la protéine CFTR-WT, le PIP $_2$ membranaire active le canal TRPV6. La PLC δ 1 est activée suite à l'augmentation de Ca $^{2+}$ intracellulaire et régule négativement TRPV6 par l'hydrolyse du PIP $_2$ en IP $_3$ et en DAG. Dans cette cellule, le complexe annexine 2-S100A10 active le canal TRPV6. Dans une cellule CF, il est reporté que le complexe annexine 2-S100A10 ne se forme pas et nous avons observé que la PLC δ 1 régule positivement le canal TRPV6. Cette régulation positive de l'influx calcique par la PLC δ 1 est contraire à ce qui est rapporté dans la littérature, et c'est un point que nous chercherons à clarifier dans cette troisième partie.

Nous avons au préalable comparé la localisation cellulaire des protéines CFTR, TRPV6 et PLC δ 1 et leur proximité par la technique de proximity ligation assay (PLA) dans les lignées 16HBE14o- et CFBE41o-, puis nous avons étudié l'expression des protéines annexine 2 et S10010 et leur proximité avec la PLC δ 1 pour expliquer la différence de régulation de l'influx calcique observée dans les cellules exprimant la mutation CFTR-F508del.

Dans un second temps, pour comprendre la régulation de TRPV6 dans les cellules mucoviscidiques, nous avons étudié l'intervention d'autres partenaires cellulaires impliqués dans la régulation de l'influx calcique en investiguant les proximités cellulaires entre TRPV6, CFTR, PLC δ 1, annexine 2 et S100A10 dans les lignées 16HBE14o- et CFBE41o- par la technique de proximity ligation assay.

B. Résultats

1. Etude de la localisation cellulaire des protéines TRPV6, PLC δ 1 et CFTR et de leur proximité dans les cellules épithéliales pulmonaires 16HBE14o- et CFBE41o-

- i. *Localisation de TRPV6-PLC δ 1-CFTR dans les cellules 16HBE14o- et CFBE41o-*

Nous avons observé la localisation des protéines CFTR, TRPV6 et PLC δ 1 dans les cellules pulmonaires polarisées CFBE41o- et 16HBE14o- de façon à identifier des éventuelles différences de localisation pouvant expliquer les différences de régulation de l'influx calcique (**Figure 38**). Comme attendu, CFTR a une localisation apicale dans les cellules 16HBE14o- tandis que CFTR-F508del est majoritairement péri-nucléaire dans les cellules CFBE41o-. Cette observation en immunofluorescence reflète bien l'expression membranaire du canal CFTR dans les cellules saines et sa rétention au niveau du réticulum dans les cellules CF. Le canal TRPV6 présente une distribution très similaire dans les cellules pulmonaires 16HBE14o- et CFBE41o- : il est présent au niveau de la membrane plasmique du côté apical des cellules polarisées, où il exerce son rôle de canal calcique, et on le retrouve également localisé en intracellulaire. Enfin, la PLC δ 1 est localisée de façon éparse à l'intérieur des cellules : elle est exprimée en intracellulaire et au niveau apical. Nous pouvons noter que l'imagerie de fluorescence reflète la faible expression de la protéine dans les cellules CFBE41o- par rapport aux cellules 16HBE14o-, donnée qui avait été précédemment observée par l'équipe. Il semblerait que la mutation CFTR-F508del n'ait donc pas d'influence sur la localisation des protéines TRPV6 et PLC δ 1.

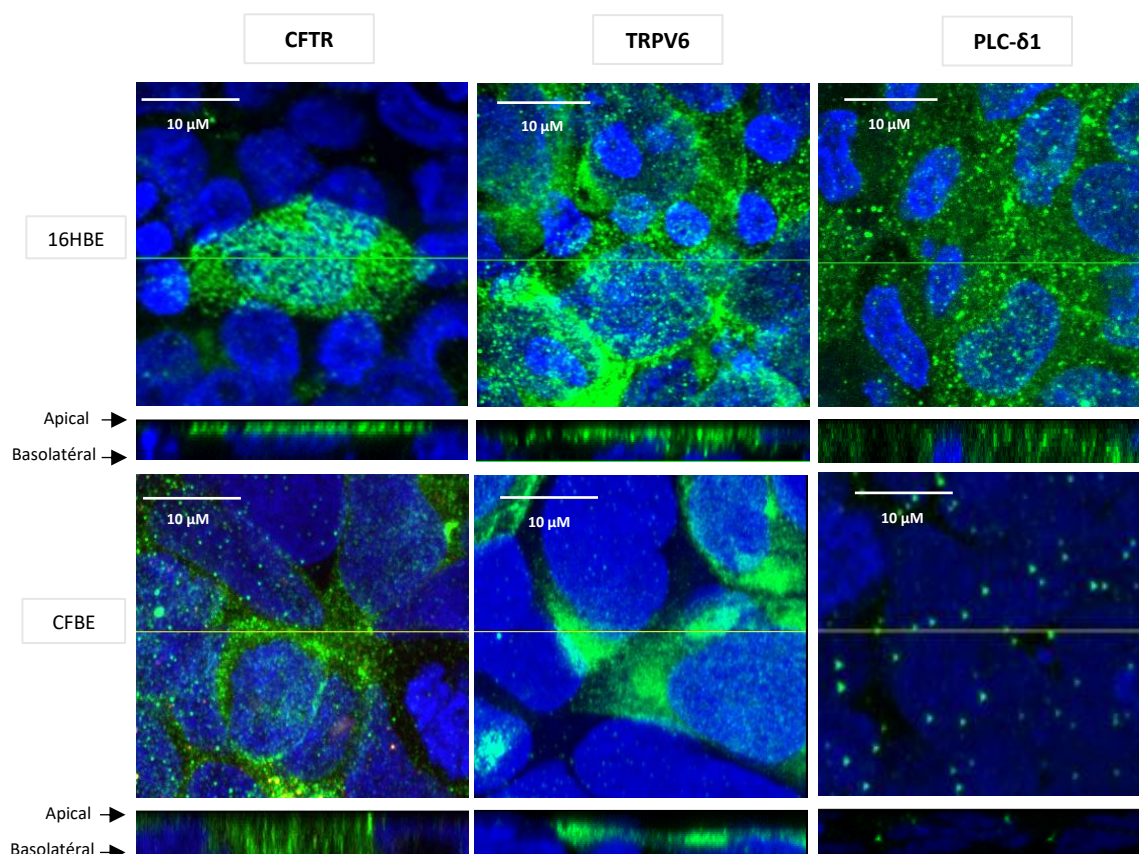


Figure 38 : Localisation cellulaire des trois protéines CFTR, TRPV6 et PLC- δ 1 dans des cultures épithéliales bronchique polarisées saines (16HBE14o-) et mucoviscidosiques (CFBE41o-)

Immunomarquage des trois protéines et projection en Z de la distribution à travers les cellules, bleu : noyaux, et vert : protéines respectives.

ii. *Étude des proximités entre TRPV6, PLC δ 1 et CFTR dans les cellules 16HBE14o- et CFBE41o-*

Nous avons ensuite comparé les proximités entre les trois acteurs TRPV6, CFTR et PLC δ 1 dans la lignée 16HBE14o- et CFBE41o- par la méthode de Proximity Ligation Assay. Cette technique est basée sur l'utilisation d'anticorps primaires spécifiques de chaque protéine, reconnus par leurs anticorps secondaires, eux-mêmes couplés à des sondes d'oligonucléotides qui s'hybrident entre elles lorsque la distance entre deux protéines est suffisamment faible (inférieure ou égale à 40nm). Il est donc préférable de parler de proximité plutôt que d'interaction, car il n'est pas exclu que d'autres partenaires puissent s'intercaler entre les deux protéines ciblées dans l'expérience. Les résultats sont présentés dans la **Figure 39**. Nous avons effectué des contrôles en mettant uniquement les sondes PLA sans les anticorps primaires et nous avons enregistré un bruit de fond équivalent à 0,1 spot/cellule.

Au-delà de ce bruit de fond, nous avons considéré que le signal détecté correspondait à une proximité entre deux partenaires.

Entre les deux lignées, nous n'avons pas observé de différence significative de proximité entre CFTR et TRPV6 avec une moyenne de 2 spots par cellule, ni entre TRPV6 et PLC δ 1 où nous avons une moyenne de 0,25 spot par cellule. Bien que TRPV6 soit régulé par la voie PLC-PIP₂, nous n'observons pas de modifications de proximités entre TRPV6 et PLC δ 1, et en effet, il est suggéré que ce soit davantage le PIP₂ qui établisse des proximités avec la PLC δ 1 (Yamamoto et al., 1999). Enfin, nous avons une proximité significativement plus faible entre CFTR et la PLC δ 1 dans les CFB410-E par rapport à celle observée dans les 16HBE140- : nous comptons une moyenne de 1,5 spots par cellules dans les 16HBE140- contre 0,5 spot par cellules dans les CFB410-. Une mesure de proximité réalisée une fois dans les cellules CFBE où la protéine CFTR-F508del a été ramenée à la membrane par la correction température a montré une augmentation du nombre de spots équivalent à celui observé dans les 16HBE (**Figure 39**, points noirs). Nous en concluons que lorsque CFTR est à la membrane, il existe une proximité avec la PLC δ 1 et cette proximité est perdue lorsque CFTR n'est plus à la membrane. Nous devons également garder en mémoire que ce n'est pas directement la PLC δ 1 qui opère une action sur le canal TRPV6, mais bien le PIP₂. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que d'autres acteurs pourraient intervenir dans les cellules CFB410- pour réguler TRPV6.

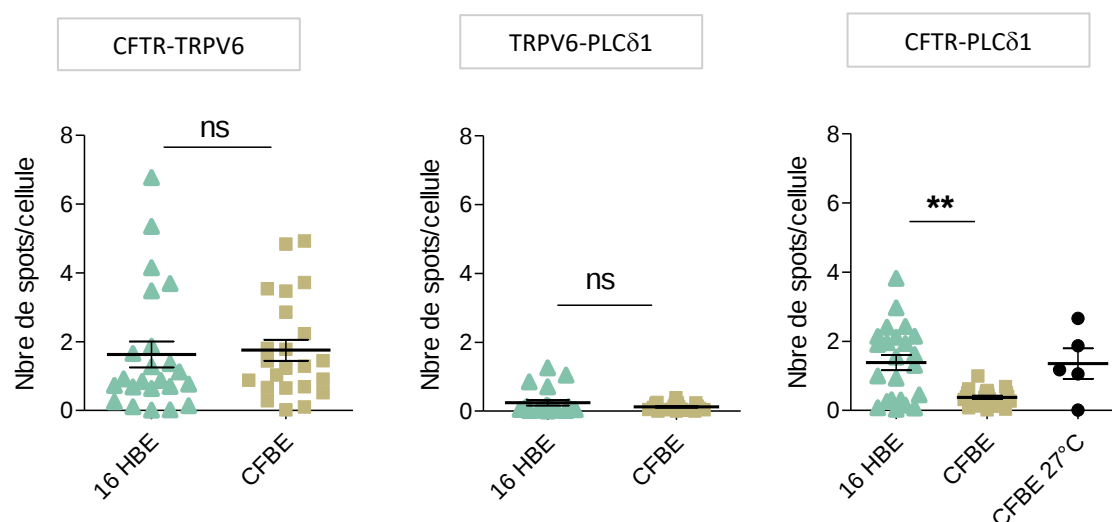


Figure 39 : Proximité entre CFTR, TRPV6 et PLC δ 1 dans les cellules 16HBE140- versus CFB410- obtenues par la technique de Proximity Ligation Assay

Histogrammes représentant la proximité, en nombre de spots par cellule, entre CFTR et TRPV6, et PLC δ 1 dans les cellules 16HBE140- et CFB410-. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM sur un champ d'environ 100 cellules (N =4). La proximité entre CFTR et PLC δ 1 a été testée dans les cellules CFB410- corrigées à 27°C pendant 24 h sur une expérience, les résultats sont représentés en noir sur la figure.

2. Étude du complexe annexine 2-S100A10 dans la régulation de l'influx calcique des cellules épithéliales pulmonaires 16HBE14o- et CFBE41o-

D'autres acteurs cellulaires, qui régulent à la fois CFTR et TRPV6, peuvent subir des défauts de fonctionnement avec la mutation CFTR-F508del. Nous nous sommes concentrés sur deux petites protéines, annexine 2 et S100A10, que l'on retrouve sous forme libre dans le cytosol et à la membrane plasmique, mais également associées en complexe à la membrane plasmique dans les cellules épithéliales pulmonaires non mucoviscidosiques (Gerke and Moss, 2002), (Thiel et al., 1992). Le complexe annexine 2-S100A10 permet, entre autre, l'acheminement des vésicules du compartiment trans-golgien à la membrane plasmique dans les cellules épithéliales polarisées et régule aussi de nombreux canaux ioniques, dont CFTR, TRPV5 et TRPV6 (Borthwick et al., 2007, 2008b; van de Graaf et al., 2003). En effet, dans les cellules épithéliales pulmonaires non mucoviscidosiques, le complexe annexine 2-S100A10 se lie à TRPV6 (Borthwick et al., 2008b). Annexine 2 et S100A10 sont donc des activateurs à la fois de CFTR et de TRPV6 et constituent des protéines intéressantes à étudier dans le cadre de notre étude. Dans cette dernière partie nous avons voulu étudier le rôle de ces deux protéines dans la régulation du canal TRPV6 dans les cellules CF.

i. Expression protéique dans les lignées 16HBE14o- et CFBE41o-

Dans des modèles de sur-expression, des expériences de GST pull-down ont montré l'existence d'une interaction entre S100A10 et TRPV6 (van de Graaf et al., 2003). Les auteurs ont également montré que la protéine S100A10 était nécessaire pour le trafic ainsi que la fonction du canal TRPV6 à la membrane. Par ailleurs, lorsque l'expression de l'annexine 2 est diminuée, les auteurs ont montré, par des expériences de patch-clamp, que la fonction du canal TRPV6 était également diminuée. Les deux protéines, à la fois S100A10 et annexine 2, interviennent donc dans la fonction du canal TRPV6.

L'expression protéique de l'annexine 2 et de S100A10 a été quantifiée dans les cellules 16HBE14o- et les CFBE41o-. Nous avons observé que l'expression de la protéine S100A10 est deux fois plus faible dans les cellules CFBE41o- par rapport aux cellules 16HBE14o-, la quantité d'annexine 2 restant, quant à elle, inchangée entre les deux lignées (**Figure 40**).

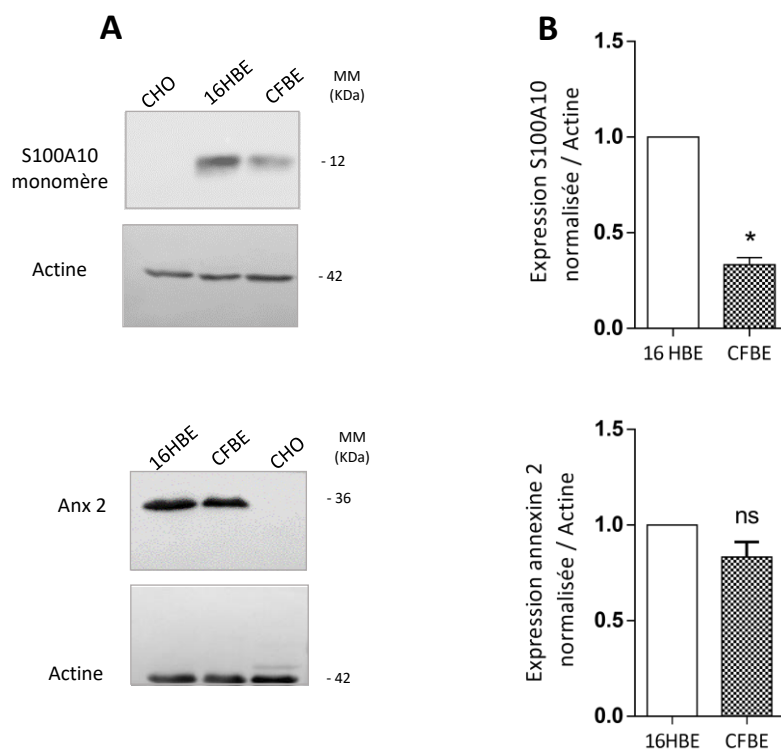


Figure 40 : Expression endogène des protéines S100A10 et annexine 2 dans les cellules 16HBE14o- et CFBE41o-

(A) Western blots représentatifs de l'expression protéique de S100A10 et de l'annexine 2 dans les cellules 16HBE14o-, CFBE41o- et les CHO. Les cellules CHO ont été utilisées comme contrôle négatif. (B) Histogrammes représentant la quantification des protéines S100A10 et annexine 2 normalisée par rapport à la quantité d'actine exprimée dans les cellules. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM (N=3). T-test, *p = 0,0183, ns = 0,1720.

ii. Proximité entre le complexe annexine 2-S100A10 et TRPV6

Nous avons alors regardé ce qu'il en était de la proximité entre les protéines S100A10, annexine 2 et TRPV6 par proximity ligation assay (**Figure 41**). Les expériences ont été réalisées seulement deux fois, mais il semble qu'il y ait une proximité plus importante entre l'annexine 2 et TRPV6 dans les cellules 16HBE14o- par rapport à celle observée dans les cellules CFBE41o-. Du reste, nous n'avons pas observé de différence de proximité entre TRPV6 et S100A10 entre les lignées 16HBE14o- et CFBE41o-.

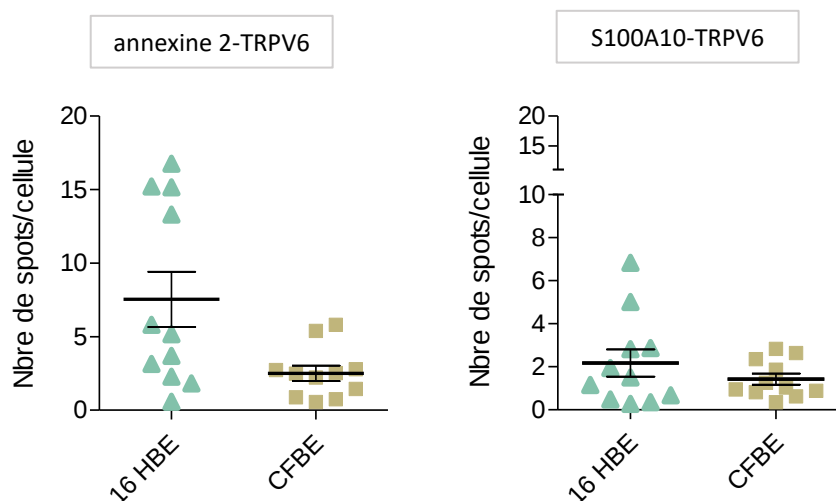


Figure 41 : Proximité entre annexine 2, S100A10 et TRPV6 dans les cellules 16HBE14o- et CFBE41o-
 Histogrammes représentant la proximité, en nombre de spots par cellule, entre annexine 2 et TRPV6, et S100A10 et TRPV6. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM sur un champ d'environ 100 cellules (N =2).

iii. Interaction du complexe annexine 2-S100A10 avec la PLC δ 1

Nous avons ensuite regardé l'existence d'une proximité entre les deux protéines annexine 2/S100A10 et la PLC δ 1 ainsi qu'entre annexine 2/S100A10 et CFTR. Des essais de duolink ont montré que la PLC δ 1 se lie faiblement à l'annexine 2 et à S100A10 dans les cellules 16HBE14o- mais que ces proximités augmentent significativement dans les cellules CFBE41o-. Les proximités entre CFTR et l'annexine 2 ont été testées seulement deux fois et n'ont pas permis la réalisation de statistiques, cependant nous observons une plus faible proximité entre l'annexine 2 et la protéine CFTR-F508del dans les cellules CFBE41o- par rapport à celle mesurée entre l'annexine 2 et la protéine CFTR dans les cellules 16HBE14o- (**Figure 42**).

Tout compte fait, même si la PLC δ 1 interagit beaucoup moins avec la protéine CFTR-F508del, elle interagit davantage avec les protéines S100A10 mais surtout avec l'annexine 2 dans les cellules CFBE41o-. Ainsi les partenaires cellulaires, au sein de complexes protéiques faisant intervenir la PLC δ 1, sont différents lorsque la protéine CFTR est mutée ou non. En effet, dans les cellules 16HBE nous observons un complexe formé de la PLC δ 1, de CFTR et de l'annexine 2 et dans les cellules CFBE, CFTR ne fait plus partie du complexe et la proximité entre l'annexine 2 et la PLC δ 1 est renforcée.

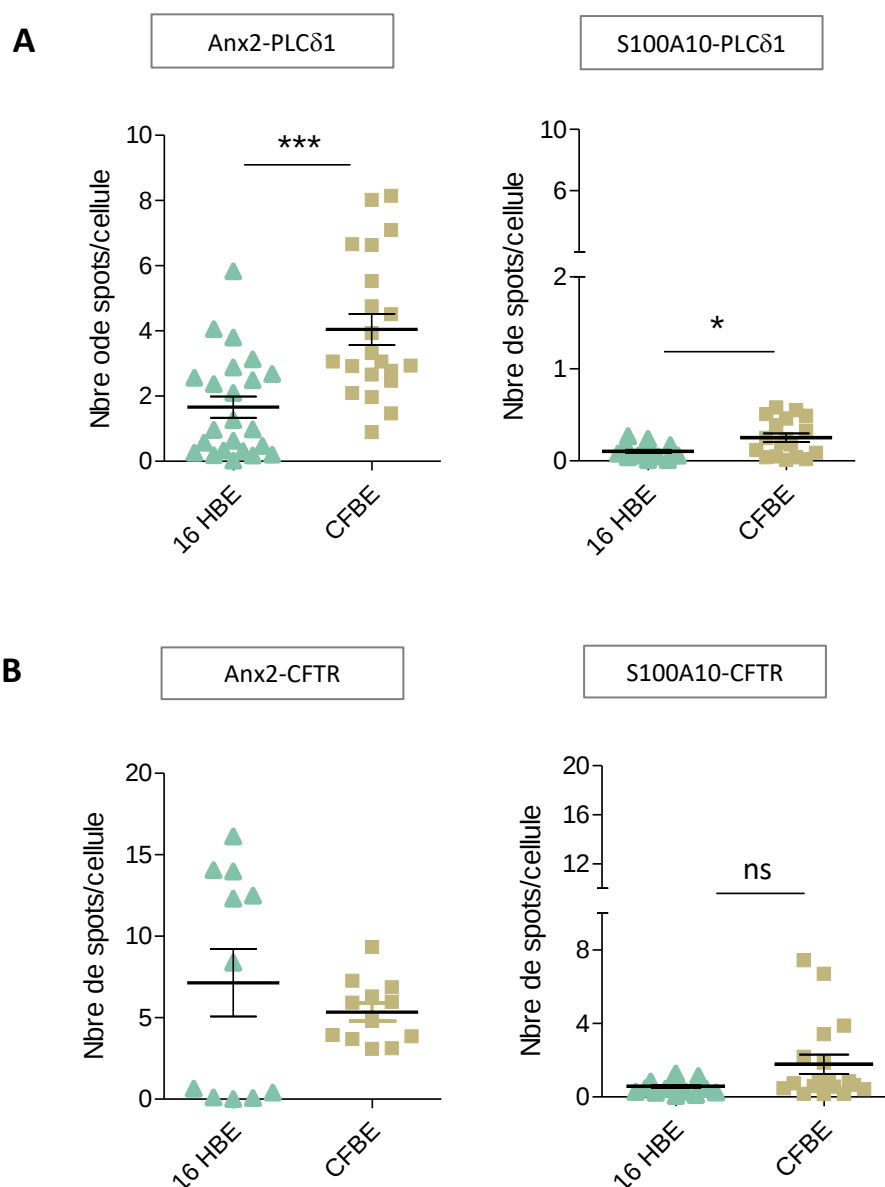


Figure 42 : Proximité entre annexine 2, S100A10, CFTR et PLC δ 1 dans les cellules 16HBE14o- versus CFBE41o-

Histogrammes représentant la proximité, en nombre de spots par cellule, entre (A) annexine 2 et PLC δ 1, S100A10 et PLC δ 1, (B) annexine 2 et CFTR, S100A10 et CFTR. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ SEM sur un champ d'environ 100 cellules (N =3) sauf pour Anx2-CFTR où N = 2. Mann-Whitney, ***p = 0,0001, *p = 0,0473, ns = 0,1082.

3. Proximité entre les différents patenaires : Résumé et conclusion

Il semblerait que les complexes protéiques qui font intervenir la PLC δ 1, TRPV6, CFTR, Annexine2 et S100A10 soient différents en fonction que le canal CFTR est muté ou non. Ces différences de proximités pourraient, en partie, expliquer les différences de régulation de l'influx calcique par la PLC δ 1 entre les cellules 16HBE14o- et CFBE41o-.

Conclusion générale

Quelques études ont mis en évidence le rôle des phospholipases C dans la sécrétion chlorure dépendante de CFTR : nous avons montré durant ce projet que deux isoformes de PLC participent en particulier à la sécrétion chlorure dépendante de CFTR dans les cellules épithéliales bronchiques humaines : la PLC β 3 et la PLC γ 1. L'activation des PLC endogènes, via la stimulation des RCPG, des récepteurs à activité tyrosine kinase ou de la protéine Epac, pourrait jouer en faveur d'une augmentation de la sécrétion d'ions chlorure et serait à propos dans le contexte de la mucoviscidose (**Figure 43 A**) Il s'avère que la PLC β 3 et la PLC γ 1 semblent également impliquées dans la régulation de l'influx calcique des cellules épithéliales bronchiques humaines : la PLC γ 1 contribue à l'entrée calcique intracellulaire tandis que la PLC β 3 diminue l'influx d'ions Ca²⁺ (**Figure 43 B**). La recherche d'activateurs/inhibiteurs spécifiques des PLC serait donc une priorité à donner à la suite du projet dans le but de moduler la sécrétion chlorure et l'homéostasie calcique dans les cellules épithéliales bronchiques mucoviscidosiques.

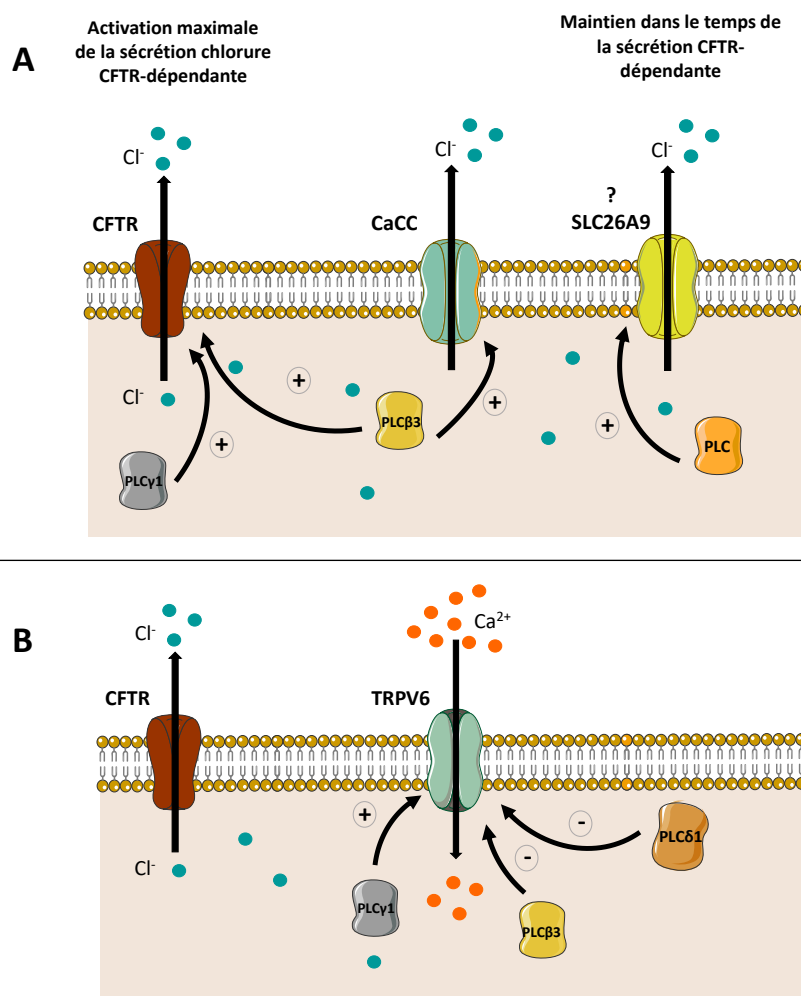


Figure 43 : Schéma résumant les principales découvertes durant le projet de thèse : les PLC stimulent la sécrétion chlorure (A) et régulent l'influx calcique dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (B)

Discussion et perspectives

PARTIE I : Exploration du rôle des PLC dans la sécrétion chlorure dépendante de CFTR

Des études ont déjà montré le rôle des phospholipases C dans la sécrétion chlorure suite à une activation par l' H_2O_2 (Ivonne et al., 2015), la forskoline (Hoque et al., 2010), l'ATP (Dutta et al., 2008) et les acides biliaires désoxycholique et chénodésoxycholique (CDCA) (Domingue et al., 2016). Namkung et ses collègues ont également montré l'implication des PLC dans un courant chlorure activé par l'ATP et sensible au CFTRinh-172 (Namkung et al., 2010). Nos résultats viennent corroborer les données de la littérature, puisque nous avons, à notre tour, identifié un rôle des PLC dans la sécrétion chlorure des cellules épithéliales bronchiques humaines suite à une activation forskoline et UTP. Les isoformes de PLC qui pourraient entrer en jeu dans la sécrétion chlorure, ainsi que les mécanismes et partenaires cellulaires engagés dans cette sécrétion seront discutés dans cette partie.

A. Les isoformes de PLC qui jouent un rôle dans la sécrétion chlorure dépendante de CFTR dans les cellules épithéliales bronchiques

1. L'inhibition pharmacologique des PLC par le composé U73122 diminue la stabilité du courant chlorure CFTR-dépendant au cours du temps

Nous avons vérifié que les PLC étaient bien impliquées dans la conductance chlorure sensible au CFTRinh-172 suite à une activation par la forskoline à la fois i) dans les cellules épithéliales bronchiques qui expriment la protéine CFTR-WT de manière endogène (16HBE14o-) et ii) dans les cellules épithéliales bronchiques CFBE41o- qui sur-expriment la protéine CFTR-WT (CFBE-WT) ou la protéine CFTR-F508del corrigée par la température (CFBE-F508del). Ainsi, l'inhibition des PLC par l'inhibiteur U73122 diminue la stabilité du courant CFTR-dépendant au court du temps d'environ 30 % par rapport à l'analogue inactif U73343 utilisé comme contrôle dans les trois lignées. Il a déjà été publié que la $\text{PLC}\delta 1$, la $\text{PLC}\gamma 1$ et la $\text{PLC}\beta 3$ sont exprimées dans des lignées cellulaires épithéliales bronchiques de manière endogène (Bezzetti et al., 2011; Vachel et al., 2015; Xu et al., 2013) et leur expression a été confirmée dans nos modèles cellulaires. Nous n'avons pas de données précises concernant l'expression des autres isoformes de PLC exprimées dans nos modèles cellulaires 16HBE14o- et CFBE41o-, mais il existe des données dans la lignée A549 issue de cellules épithéliales pulmonaires humaines provenant d'un adénocarcinome ainsi que dans la lignée HBEC3-KT issue de cellules épithéliales bronchiques humaines provenant d'un sujet sain (**Figure 44**).

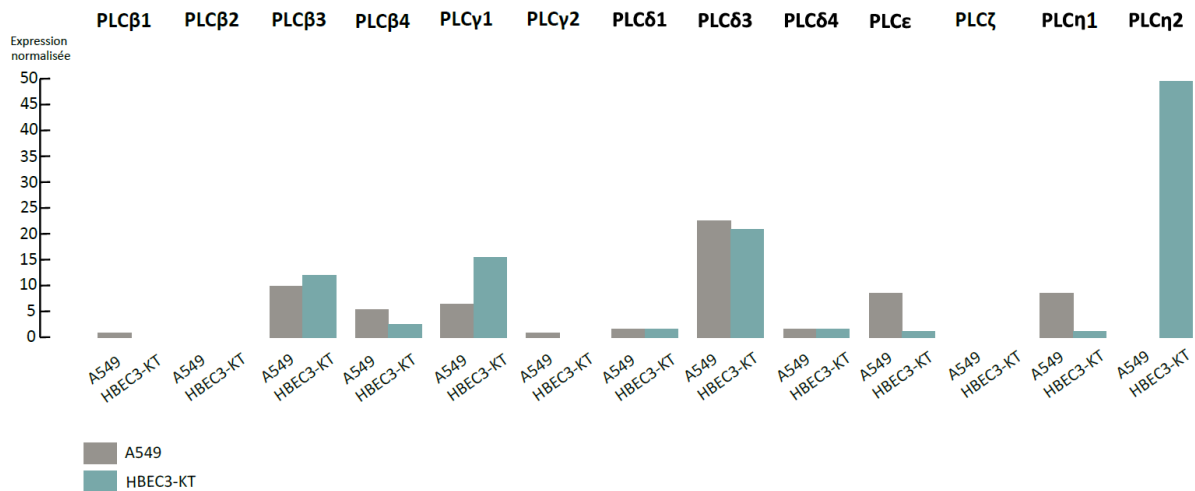


Figure 44 : Expression normalisée de la quantité d'ARN des 13 isoformes de PLC dans les lignées A549 et HBEC3-KT

La lignée A549 est une lignée pulmonaire épithéliale humaine issue d'un adénocarcinome et la lignée HBEC3-KT est une lignée bronchique épithéliale humaine. <https://www.proteinatlas.org>

Si l'on se fie à l'ARN exprimé dans les lignées A549 et HBEC3-KT, la PLCβ4, la PLCδ3, la PLCδ4, la PLCε, la PLCη1 et la PLCη2 sont également susceptibles d'être exprimées dans les cellules épithéliales pulmonaires et de jouer un rôle dans le courant chlorure dépendant de CFTR.

La réalisation de western blots de ces six isoformes de PLC dans les lignées 16HBE14o- et CFBE41o- permettrait d'identifier celles qui sont effectivement exprimées dans nos modèles et qui pourraient intervenir dans le maintien de la sécrétion chlorure CFTR-dépendante au cours du temps.

2. La diminution de l'expression de la PLCγ1 ou de la PLCβ3 diminue l'activation maximale du courant chlorure CFTR-dépendant

L'objectif était de caractériser, parmi les différentes isoformes de phospholipases, celles qui sont impliquées dans la sécrétion d'ions chlorures dans nos modèles cellulaires. Nous nous sommes concentrés sur les PLCδ1, PLCγ1 et PLCβ3 qui sont exprimées dans nos modèles cellulaires. À l'aide de la technique d'interférence par ARN dirigée contre ces trois isoformes dans la lignée 16HBE14o- nous avons observé que, à la différence de la PLCδ1, les PLCγ1 et PLCβ3 interviennent dans le courant CFTR-dépendant activé par la forskoline. Par la suite, l'implication de la PLCβ3 dans ce courant CFTR-dépendant a aussi été confirmée dans les cellules CFBE-F508del corrigées et dans leurs cellules contrôles qui sont les CFBE-WT. De cette manière, lorsque l'expression de la PLCβ3 est diminuée,

l'activation du courant chlorure CFTR-dépendant est réduit de 25 % dans les cellules CFBE-WT ainsi que dans les cellules CFBE-F508del corrigées. La PLC γ 1 et la PLC β 3 interviennent donc dans la sécrétion chlorure dépendante de CFTR. Cependant d'autres isoformes de PLC pourraient participer à la sécrétion chlorure dépendante du CFTR (**Figure 44**).

Par la suite, une stratégie d'interférence par ARN dirigée contre les autres isoformes de PLC exprimées de manière endogène dans nos modèles pourrait déterminer quelles PLC, en plus de la PLC γ 1 et de la PLC β 3, pourraient intervenir dans l'activation du courant CFTR-dépendant.

Les expériences en chambre de Ussing permettent d'observer la résultante de l'activation de plusieurs conductances ioniques, et pas seulement celles qui résultent de l'activité du canal CFTR. L'ajout de DIDS, un inhibiteur des canaux chlorure autres que CFTR n'empêche pas la diminution d'activation du courant CFTR-dépendant d'avoir lieu en présence du siRNA PLC β 3. Ce résultat suggère que la PLC β 3 exerce une action sur le courant CFTR.

Des expériences de patch-clamp dans les CFBE410- transfectées avec le siRNA PLC β 3 pourraient confirmer l'impact de la diminution d'expression de cette protéine sur la fonction du canal CFTR.

Comment les PLC γ 1 et PLC β 3 impactent-elles le courant chlorure CFTR-dépendant ? Compte tenu du fait que les PKC interviennent dans la phosphorylation du canal CFTR et qu'elles sont activées sous l'action des PLC, nous avons tenté de répondre à cette question en regardant le rôle des PKC dans l'activation du courant CFTR-dépendant par la PLC β 3. L'inhibition des PKC par le composé Gö6983 diminue faiblement le courant chlorure CFTR-dépendant, ceci dans les cellules transfectées avec le siRNA PLC β 3 et dans les cellules transfectées avec le siRNA contrôle. Il semblerait donc que ce ne soit pas les PKC qui soient impliquées dans l'activation du courant chlorure par la PLC β 3. L'inhibiteur de PKC utilisé, le Gö6983, est un inhibiteur à spectre large qui bloque les PKC α , PKC β , PKC γ , PKC δ et PKC ζ à la concentration utilisée de 1 μ M. Il se pourrait tout de même que d'autres isoformes de PKC soient activées par la PLC β 3 et exercent une action sur le canal CFTR.

Il semblerait, en effet, que parmi les isoformes de PKC existantes, la PKC ϵ soit impliquée dans les mécanismes d'activation du courant CFTR-dépendant (Alcolado et al., 2011; Alshafie et al., 2014). Il pourrait-être utile de refaire les expériences de fonctionnalité sur des cellules transfectées avec le siRNA contrôle ou le siRNA PLC β 3 en présence du peptide inhibiteur des PKC ϵ , le peptide EAVSLKPT.

Au cours de nos expériences, nous n'avons pas déterminé de quelle manière les phospholipases C exercent précisément leur action sur le courant chlorure CFTR dépendant. Cependant nous avons identifié, dans la littérature, l'existence de partenaires communs entre les PLC β 3, PLC γ 1 et CFTR qui apportent un élément de réponse (**Figure 45**).

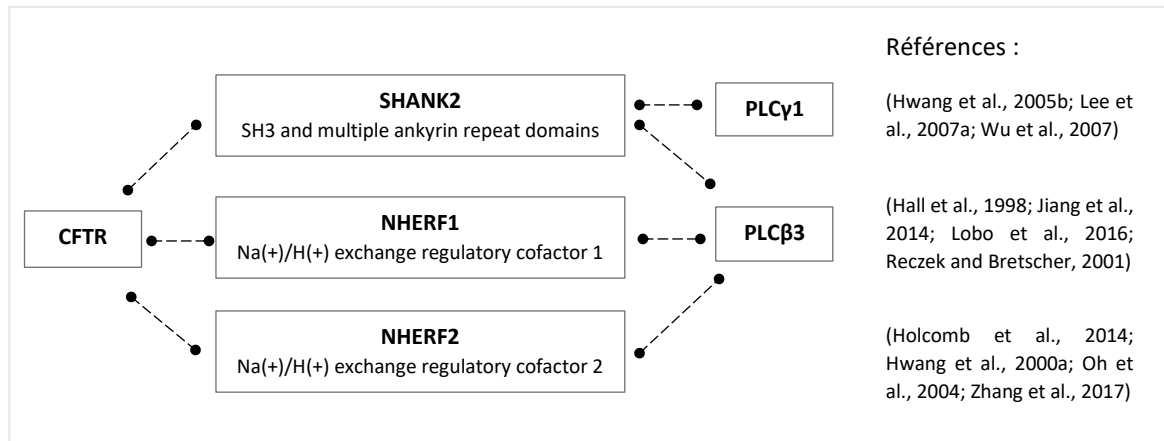


Figure 45 : Partenaires communs entre CFTR et les phospholipases C identifiés dans la littérature

En effet, les PLC β et CFTR sont régulés par des protéines qui contiennent des domaines PDZ (Kim et al., 2011b; Raghuram et al., 2001). Par exemple, il a été mis en évidence qu'il existe des liens fonctionnels entre les protéines NHERF (Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor) et CFTR (Arora et al., 2014; Zhang et al., 2017) mais aussi entre les protéines NHERF et PLC β 3 (Jiang et al., 2014; Oh et al., 2004). En effet, au niveau de son extrémité COOH, il a été montré que CFTR établit des liaisons avec des domaines PDZ (Guggino and Stanton, 2006; Wang et al., 1998; Xia et al., 2016). Ainsi NHERF1 interagit avec l'extrémité COOH du canal CFTR pour le stabiliser à la membrane (Arora et al., 2014; Sharma et al., 2016). De plus, les protéines NHERF1 et NHERF2 interviennent dans la phosphorylation de CFTR et favorisent donc l'activité du canal (Broadbent et al., 2017). Une étude dans un modèle murin KO (en anglais « Knock out ») pour la protéine NHERF1 a montré que cette protéine est requise pour l'obtention d'une activation maximale du courant chlorure CFTR-dépendant par la forskoline au niveau de l'épithélium intestinal (Broere et al., 2007). En outre, l'activation du courant chlorure CFTR-dépendant dans le modèle murin KO diminue de 35 % par rapport au modèle contrôle. Cette diminution est du même ordre de grandeur que celle que nous observons suite à la diminution de l'expression de la PLC β 3 dans notre étude (25 %). Par conséquent, la PLC β 3, via son interaction avec la protéine NHERF, pourrait jouer un rôle dans la sécrétion chlorure dépendante de CFTR en favorisant l'interaction entre les protéines NHERF et CFTR. Les lignées épithéliales pulmonaires A549 et HBEC3-KT expriment l'ARN des protéines NHERF1 et NHERF2 (**Figure 46**), suggérant que des interactions pourraient s'établir entre CFTR et la PLC β 3 via ces deux protéines pour favoriser la sécrétion chlorure.

Pour tester cette hypothèse il serait intéressant de regarder l'expression des protéines NHERF ainsi que la localisation des trois protéines NHERF, CFTR et PLC β 3 dans les lignées 16HBE14o- et CFBE41o- en immunomarquage et de regarder les interactions entre ces trois partenaires par la technique de co-immunoprécipitation. L'idéal serait, par la suite, et si l'existence de telles interactions se confirment, de réaliser des mutants au niveau des sites d'interactions entre NHERF et la PLC β 3 et de regarder les répercussions sur le courant CFTR-dépendant en chambre de Ussing.

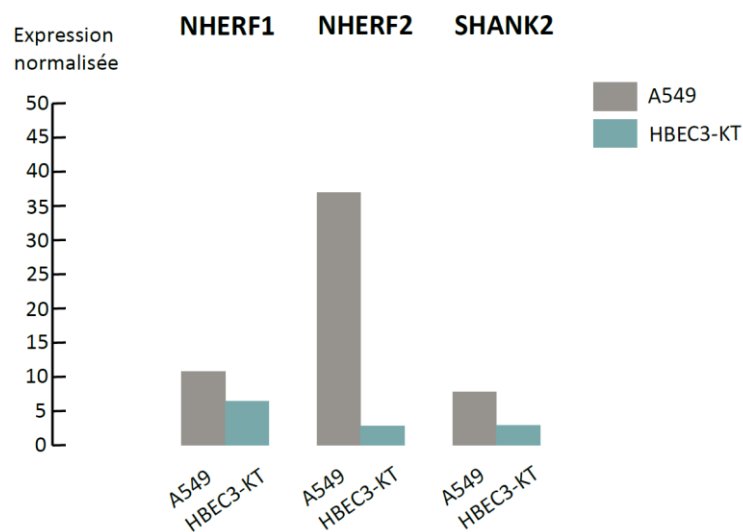


Figure 46 : Expression normalisée de la quantité d'ARN des protéines NHERF1, NHERF2 et SHANK2 dans les lignées A549 et HBEC3-KT

La lignée A549 est une lignée pulmonaire épithéliale humaine issue d'un adénocarcinome et la lignée HBEC3-KT est une lignée bronchique épithéliale humaine. <https://www.proteinatlas.org>

Il n'est pas renseigné dans la littérature que la PLC γ 1, qui intervient également dans le courant chlorure CFTR-dépendant dans les cellules qui expriment la protéine CFTR-WT de manière endogène, soit régulée par des protéines via des domaines PDZ. D'ailleurs les PLC γ , contrairement aux PLC β , ne possèdent pas de domaine PDZ sur leur structure et ne sont à priori pas régulées par les protéines NHERF. En revanche, la PLC γ 1 et la protéine CFTR partagent une affinité pour la protéine SHANK2 (en anglais «SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2 ») (Lee et al., 2007a; Wu et al., 2007). Par ailleurs il a été mis en évidence que SHANK2 régule négativement CFTR (Kim et al., 2004; Lee et al., 2007a). Compte tenu de ces informations nous pouvons émettre une hypothèse : la PLC γ 1, en établissant des liaisons avec la protéine SHANK2, intervient dans le courant chlorure CFTR-dépendant en diminuant l'interaction entre les protéines CFTR et SHANK2.

Afin de valider cette hypothèse, l'expression de SHANK2 dans nos modèles cellulaires devra être confirmée par western blot, de même que les interactions SHANK2-PLC γ 1 et SHANK2-CFTR. Pour aller encore plus loin, et si de telles interactions sont établies dans nos modèles cellulaires, il serait intéressant de réaliser des mutants de la protéine PLC γ 1 avec une délétion au niveau de son domaine SH3, puisque c'est via ce domaine qu'elle interagit avec SHANK2, et d'exprimer cette protéine dans nos modèles pour réaliser des expériences de fonctionnalité du courant chlorure CFTR-dépendant en chambre de Ussing.

B. Les différences observées entre l'effet siRNA et l'effet inhibition pharmacologique des PLC dans les cellules CFBE suggèrent que les PLC sont impliquées dans deux mécanismes différents pour favoriser la sécrétion chlorure

Nous avons observé deux cinétiques distinctes impliquant les PLC au cours des enregistrements du courant chlorure dépendant de CFTR en chambre de Ussing. D'une part, l'inhibition pharmacologique des PLC réduit la stabilité du courant chlorure CFTR-dépendant en fonction du temps. D'autre part, la diminution de l'expression de la PLC β 3, par transfection de siRNA, diminue l'activation maximale du courant chlorure CFTR-dépendant. De plus, l'intervention conjointe, au cours des expériences en chambre de Ussing, de la transfection avec le siRNA PLC β 3 et de l'inhibiteur pharmacologique U73122, diminue à la fois l'activation maximale et la stabilité au cours du temps du courant chlorure CFTR-dépendant. Ainsi les deux effets sont cummulés : même lorsque l'expression de la PLC β 3 est diminuée, l'inhibiteur U73122 induit une chute de courant au cours du temps. Dès lors, l'activation du courant CFTR-dépendant et son maintien au cours du temps semblent tous les deux dépendant des PLC, mais agissent, semblerait-il, via deux mécanismes distincts et impliquant potentiellement des isoformes de PLC différentes. En effet, le composé U73122 inhibe plusieurs isoformes de PLC et n'est pas spécifique, contrairement à l'utilisation de siRNA.

Il apparaît que l'inhibiteur pharmacologique des PLC et l'interférence par ARN exercent deux effets distincts. Nous avons identifié deux isoformes de PLC comme étant importantes pour obtenir une activation maximale du canal CFTR. Pour identifier, par la suite, quelles isoformes de PLC sont importantes pour le maintien de la sécrétion chlorure dans le temps, il faudrait recourir à des peptides bloquants des différentes isoformes des PLC, à commencer, bien sûr, par celles qui sont exprimées dans nos modèles.

Dans nos expériences nous avons utilisé des cellules épithéliales comme modèles. Ces cellules sur-expriment le canal CFTR mais elles expriment également d'autres canaux de manière endogène.

Nous avons mis en place deux expériences pour identifier si le maintien du courant CFTR-dépendant dans le temps, et qui fait intervenir les PLC, serait dû à l'activité d'un autre canal chlorure. En premier lieu, l'utilisation du DIDS, inhibiteur des canaux chlorure non CFTR, a montré que le maintien de la sécrétion chlorure dépendante de CFTR dans le temps était le fait d'un autre canal chlorure. En effet, cette chute de courant induite par l'inhibiteur U73122, est bloquée en présence de DIDS lorsqu'il est déposé du côté apical des chambres de Ussing, mais pas lorsqu'il est déposé du côté basolatéral. Autrement dit un canal chlorure, autre que CFTR, exprimé dans les cellules épithéliales bronchiques au niveau apical, dont l'activité dépend de celle du canal CFTR, a besoin des PLC pour son activité.

En deuxième lieu nous avons observé que la diminution du courant CFTR-dépendant au cours du temps et occasionnée par l'inhibiteur U73122, n'est pas dépendante du Ca^{2+} intracellulaire. Le maintien du courant CFTR-dépendant dans le temps n'est donc pas le fait d'un canal chlorure activé par le calcium. Nous émettons l'hypothèse que le canal chlorure concerné dans le maintien de la conductance CFTR-dépendante pourrait être le canal SLC26A9. Il s'agit, en effet, d'un canal constitutivement actif, exprimé de manière endogène dans les cellules épithéliales pulmonaires qui expriment la protéine CFTR-WT mais aussi CFTR-F508del, qui nécessite la présence du canal CFTR pour pouvoir être activé et qui est sensible au DIDS (Balázs and Mall, 2018; Bertrand et al., 2009, 2017; Lohi et al., 2002). De plus, l'ARNm du canal SLC26A9 est détecté dans les lignées épithéliales bronchiques 16HBE14o- et CFBE41o- (Salomon et al., 2016). Les molécules pharmacologiques utilisées pour inhiber le canal SCL26A9, à savoir le DIDS > NPPB = NFA > GlyH-101, inhibent également le canal CFTR et n'ont pas pu être utilisés dans nos modèles cellulaires qui expriment les deux canaux pour discriminer l'un vis-à-vis de l'autre (Salomon et al., 2016). Le CFTRinh-172 inhibe spécifiquement le canal CFTR sans toucher le canal SLC26A9, seulement comme l'activité du canal SLC26A9 dépend de l'activité du canal CFTR, ce n'est pas non plus un bon moyen pour discriminer les deux canaux dans nos modèles qui ne sur-expriment que CFTR et non SLC26A9.

Il existe de plus en plus d'arguments dans la littérature qui témoignent d'une relation étroite entre le canal CFTR et le canal SLC26A9. D'abord, le canal SLC26A9 se comporte comme le canal CFTR : son expression augmente après une correction température à 27°C et des expériences de biotinylation de surface ont montré que dans les cellules CFBE-WT et CFBE-F508del, il est exprimé en intracellulaire mais également à la membrane apicale lorsque les cellules sont cultivées en air-liquide (Avella et al., 2011). De plus, l'expression membranaire du canal SLC26A9 dans les cellules CFBE-F508del augmente lorsque les cellules sont corrigées à 27°C (Avella et al., 2011). Ceci indique que dans nos expériences, si le canal SLC26A9 est bel et bien exprimé de manière endogène dans nos lignées, il se trouve à la membrane dans les conditions auxquelles nous avons fait nos expériences en chambre de Ussing et pourrait être impliqué dans la sécrétion chlorure enregistrée. D'autre part, si l'activité du canal SLC26A9 dépend de l'activité de CFTR (Bertrand et al., 2009, 2017), l'activité de CFTR est également

sous la dépendance du canal SLC26A9. En effet, des expériences de patch-clamp ont montré une augmentation de l'activité basale de CFTR, mais également une augmentation de l'activation forskoline, en présence du canal SLC26A9 (Avella et al., 2011). Enfin, au-delà de l'interaction fonctionnelle, il a aussi été observé que le canal SLC26A9 interagit physiquement avec la protéine CFTR-WT et la protéine-F508del corrigée (Avella et al., 2011).

Il faudrait réaliser des western blots de la protéine SLC26A9 dans nos lignées cellulaires pour confirmer son expression endogène. Pour déterminer si les phospholipases C exercent réellement une action sur le canal SLC26A9, il faudrait également réaliser des expériences de patch-clamp dans des cellules épithéliales bronchiques transfectées avec le canal SLC26A9 et comparer son activité en présence ou en absence de l'inhibiteur U73122. Le lien entre les phospholipases C et le canal SLC26A9 pourrait également être établi en chambre de Ussing via l'utilisation de cellules qui sur-expriment ce canal.

C. La PLC β 3 intervient dans l'activation des CaCC par l'UTP dans les cellules CFBE

Il est un fait établi que les phospholipases C interviennent dans l'activation des CaCC suite à une stimulation par l'ATP ou l'UTP dans les cellules qui expriment CFTR (Lérias et al., 2018; Namkung et al., 2010; Yamamoto et al., 2007). Nous avons confirmé ce fait dans les cellules épithéliales bronchiques qui expriment la protéine CFTR-WT ou CFTR-F508del corrigée à la membrane. L'utilisation du composé U73122 diminue significativement le courant chlorure suite à une stimulation par l'UTP. Plus particulièrement, nous avons mis en évidence l'implication de la PLC β 3 dans l'activation des CaCC par l'UTP dans nos modèles cellulaires. En effet, l'UTP est un ligand des récepteurs P2Y₂ et P2Y₄ couplés aux protéines G_{q/11}, ces deux récepteurs sont exprimés dans les cellules humaines et activent les PLC β (Burnstock, 2012; Magni and Ceruti, 2013; Rafahi and Müller, 2018; Rhee, 2001). L'utilisation de l'inhibiteur des PLC U73122 sur des cellules transfectées avec le siRNA PLC β 3 réduit davantage encore le courant chlorure activé par l'UTP. Ce résultat suggère que d'autres PLC β sont impliquées dans l'activation des CaCC par l'UTP et notamment la PLC β 4, qui semble exprimée dans les cellules épithéliales bronchiques (**Figure 44**).

Pour mettre en évidence si d'autres PLC sont impliquées dans l'activation des CaCC il faudra envisager de réaliser des expériences d'interférence par ARN contre les autres isoformes de PLC β exprimées dans les cellules CFBE, en commençant par la PLC β 4.

Il a été montré que le canal TMEM16A interagit avec les protéines CFTR-WT et CFTR-F508del par le biais de protéines contenant des motifs PDZ (Benedetto et al., 2017). Il se pourrait que les PLC puissent

jouer sur le courant CaCC via une interaction avec ces motifs PDZ. Il est notamment suggéré que NHERF1 fasse partie de ces protéines adaptatrices entre le TMEM16A et CFTR (Kunzelmann et al., 2019).

En vue d'approfondir l'existence d'interactions physiques entre la PLC β 3 et le canal TMEM16A, il serait intéressant de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation dans des modèles de surexpression.

Nous avons vu que la transfection par le siRNA PLC β 3 dans les cellules CFBE-WT diminue l'expression de CFTR. Il se pourrait également que cette transfection affecte l'expression des CaCC dans nos modèles cellulaires. Dans cette hypothèse, la diminution du courant activé par l'UTP en présence du siRNA PLC β 3 serait due à la diminution d'expression des CaCC et la réduction de courant supplémentaire, observée en présence de l'inhibiteur U73122, serait due à l'inhibition des PLC.

Plusieurs CaCC peuvent potentiellement être activés dans nos expériences : l'ARN des canaux TMEM16A, TMEM16F, TMEM16H et TMEM16J est exprimé dans les cellules CFBE (Ousingsawat et al., 2011) et dans cette lignée l'expression de TMEM16A est notamment confirmée par western blot (Ruffin et al., 2013). Par conséquent le canal TMEM16A, mais aussi les canaux TMEM16F, TMEM16H et TMEM16J sont susceptibles d'être activés par l'UTP dans nos expériences.

Afin de comprendre la régulation des CaCC par les PLC, des western blots des principaux CaCC identifiés dans les cellules CFBE devront être réalisés pour i) identifier les canaux exprimés dans nos lignées et ii) quantifier l'expression des canaux TMEM16 dans la condition siRNA PLC β 3 et siRNA contrôle.

PARTIE II : Étude de la régulation de l'influx calcique par les phospholipases C

Cette deuxième partie du projet se concentre sur l'influx calcique constitutivement actif dans les cellules épithéliales bronchiques. Dans la mucoviscidose, et notamment dans les cellules qui expriment la mutation CFTR-F508del, il a été rapporté que l'homéostasie calcique est perturbée. Dans ces cellules, entre autres, les mobilisations calciques sont plus importantes. Par exemple, l'influx calcique des canaux TRPV4, TRPA1, TRPV6 et TRPC6 qui suit la stimulation par leur agonistes respectifs, est augmenté dans les cellules qui expriment la mutation CFTR-F508del par rapport aux cellules qui expriment la mutation CFTR-WT (Antigny et al., 2008b, 2011b; Grebert et al., 2019)

Les PLC contrôlent un certain nombre de canaux sensibles au calcium, et notamment les canaux qui sont activés par le PIP₂, tels que les canaux TRPM8 (Rohács et al., 2005; Yudin et al., 2011), TRPV1 (Lishko et al., 2007; Lukacs et al., 2007), TRPV2 (Mercado et al., 2010) et TRPV6 (Thyagarajan et al., 2009). Lorsque la protéine CFTR est mutée, beaucoup de canaux TRP subissent des défauts de fonctionnement : c'est le cas du canal TRPV6. La PLCδ1 est un des régulateurs de TRPV6, et sa régulation par cette isoforme de PLC a précédemment été étudié au laboratoire dans les cellules épithéliales bronchiques 16HBE14o- qui expriment la protéine CFTR-WT de manière endogène (Vachel et al., 2015). Dans ces cellules, il est observé que la PLCδ1, inhibe l'influx calcique qui transite par le canal TRPV6. Notre intention au cours du projet était de comprendre le rôle de la PLCδ1 dans la régulation de l'influx calcique, mais cette fois dans les cellules épithéliales bronchiques CFBE41o- qui expriment la protéine CFTR-F508del de manière endogène.

Il se trouve que la PLCδ1 ne régule pas l'influx calcique induit par une solution à 2,5 mM de Ca²⁺ de la même manière dans les cellules qui expriment la mutation CFTR-F508del CFTR par rapport aux cellules qui expriment la mutation CFTR-WT. En effet, des expériences d'interférence par ARN dirigées contre la PLCδ1 montrent qu'au lieu de diminuer l'influx calcique, la PLCδ1 l'augmente dans les cellules CFBE41o-. Ce résultat a été confirmé dans les cellules primaires hAECB CF et hAECB non CF : la PLCδ1 inhibe l'influx calcique dans les cellules hAECB non CF et active l'influx calcique dans les cellules hAECB CF. Nous avons ensuite regardé le rôle de la PLCγ1 et de la PLCβ3 dans l'influx calcique des cellules hAECB non CF et hAECB CF. Là encore nous avons observé des différences dans la régulation de l'influx calcique par ces deux isoformes de PLC entre les cellules qui expriment le CFTR-WT et celles qui expriment le CFTR-F508del (**Tableau 14**).

Bien qu'elles ne soient, à priori, pas activées par une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire, il semblerait que la PLCγ1 et la PLCβ3 participent à la régulation de l'influx calcique dans les cellules épithéliales bronchiques non CF. Par ailleurs il est possible qu'il se produise un phénomène de compensation entre

les différentes isoformes de PLC dans les cellules qui expriment la protéine CFTR-F508del, puisque nous avons une régulation strictement opposée de l'influx calcique entre la PLC δ 1 et la PLC γ 1 (**Tableau 14**).

Nos résultats suggèrent que dans les cellules qui expriment la mutation CFTR-F508del de manière endogène, la PLC δ 1 régule positivement l'influx calcique constitutif tandis que la PLC γ 1 régule, à l'inverse, positivement l'influx calcique constitutif. Ces résultats pourraient être mis à profit dans le contexte inflammatoire de la mucoviscidose où il a été montré que le calcium participe à augmenter l'inflammation via une activation de la voie NF- κ B (Ribeiro, 2006; Tabary et al., 2006). Nous pourrions en effet envisager d'inhiber la PLC δ 1 et d'activer la PLC γ 1 chez les patients pour diminuer l'inflammation exacerbée par le calcium intracellulaire au niveau des cellules pulmonaires. Il faudrait confirmer les effets de ces deux isoformes de PLC sur la régulation de l'influx calcique constitutif dans un contexte inflammatoire et infectieux, à savoir en présence de surnageant bactérien et d'interleukines inflammatoire.

Il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences de mesure de l'influx calcique dans nos cellules, cette fois en présence de LPS bactérien et d'interleukines pour évaluer si la régulation de l'influx calcique par les PLC s'effectue également en contexte inflammatoire.

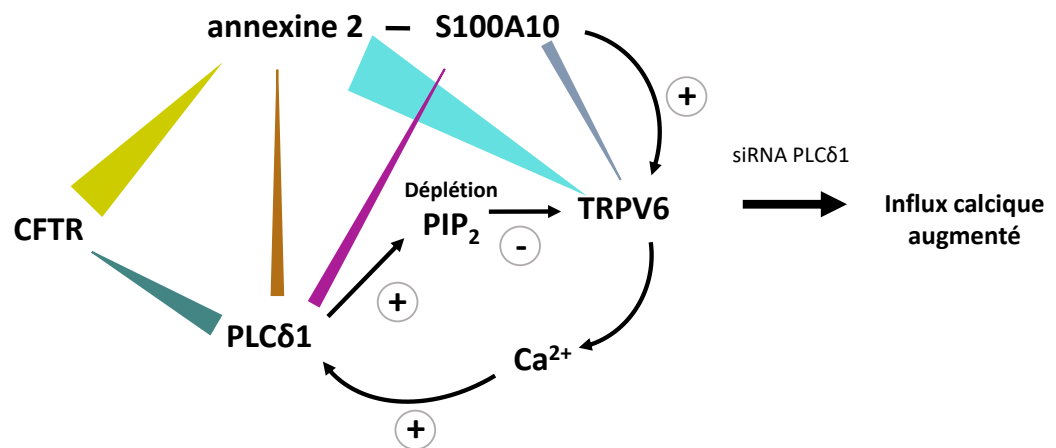
Nous rappelons que les résultats de cette dernière partie du projet sont à prendre avec précaution puisqu'il s'agit de résultats préliminaires qui sont pour la plupart réalisés en nombre insuffisant. Nous nous sommes ensuite plus particulièrement intéressés à la régulation de TRPV6 par la PLC δ 1 car elle a déjà été étudiée dans la littérature. Comment cela se fait-il que cette PLC régule négativement l'influx calcique, comme il est par ailleurs décrit que celle-ci s'effectue dans d'autres modèles cellulaires, dans les cellules épithéliales bronchiques non CF, alors qu'elle semble intervenir dans l'activation de l'influx calcique dans les cellules épithéliales bronchiques CF ? Nous sommes allés chercher la réponse au sein de complexes moléculaires qui pourraient se former autour de TRPV6 et qui seraient différents lorsque la protéine CFTR est mutée. En effet, TRPV6 n'est pas seulement régulé par la PLC δ 1. Parmi les autres protéines qui interviennent dans cette régulation nous avons étudié les protéines annexine 2 et S100A10. À l'aide des expériences de proximity ligation assay nous avons comparé les proximités entre les protéines CFTR-WT/CFTR-F508del, PLC δ 1, TRPV6, annexine 2 et S100A10 (**Figure 47**).

À partir des résultats obtenus nous avons émis une hypothèse concernant la différence de régulation du canal TRPV6 par les protéines annexine 2 et PLC δ 1 : la PLC δ 1 régule négativement TRPV6 via la déplétion membranaire du PIP₂ mais interagit également avec différents acteurs cellulaires. Elle entretient une faible proximité avec l'annexine 2 dans les cellules non CF alors qu'elle entretient une proximité plus importante avec cette protéine dans les cellules CF. Tout se passe comme si dans les

cellules CF, la PLC δ 1 potentialise l'activation de TRPV6 par le complexe annexine 2-S100A10. Ainsi dans les cellules non CF, lorsqu'on diminue l'expression de la PLC δ 1 par siRNA, nous observons globalement une augmentation de l'influx calcique puisque, n'étant pas associée au complexe annexine 2-S100A10, elle intervient surtout dans la déplétion du PIP₂. En revanche la diminution d'expression de la PLC δ 1 par siRNA dans les cellules CF diminue la potentialisation de l'activité de TRPV6 par le complexe annexine 2-S100A10.

Le nombre d'expériences réalisées étant insuffisant, il faudra confirmer cette hypothèse par une deuxième technique permettant l'étude des interactions, telle que la co-immunoprécipitation.

Cellule non CF



Cellule CF

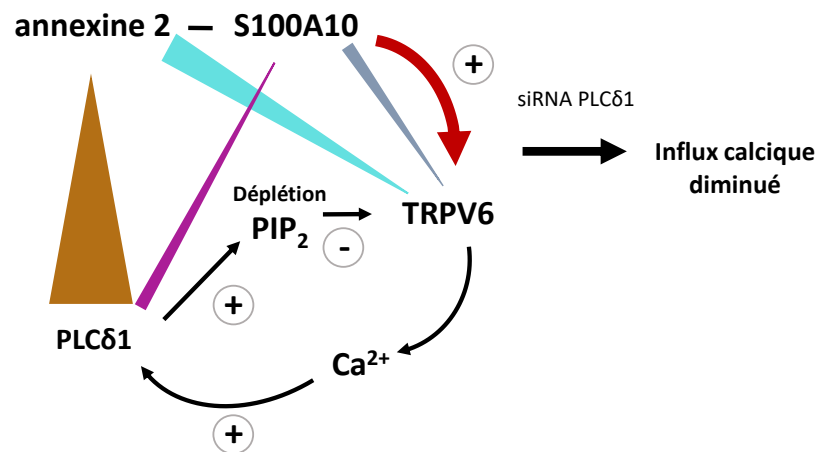


Figure 47 : Résumé des proximités étudiées par la méthode de proximity ligation assay entre la PLCδ1 et le canal TRPV6

Références bibliographiques

- Abbattiscianni, A.C., Favia, M., Mancini, M.T., Cardone, R.A., Guerra, L., Monterisi, S., Castellani, S., Laselva, O., Di Sole, F., Conese, M., et al. (2016). Correctors of mutant CFTR enhance subcortical cAMP-PKA signaling through modulating ezrin phosphorylation and cytoskeleton organization. *J. Cell. Sci.* **129**, 1128–1140.
- Adamski, F.M., Timms, K.M., and Shieh, B.H. (1999). A unique isoform of phospholipase C β 4 highly expressed in the cerebellum and eye. *Biochim. Biophys. Acta* **1444**, 55–60.
- Alcolado, N., Conrad, D.J., Rafferty, S., Chappe, F.G., and Chappe, V.M. (2011). VIP-dependent increase in F508del-CFTR membrane localization is mediated by PKC ϵ . *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **301**, C53–65.
- Allen, V., Swigart, P., Cheung, R., Cockcroft, S., and Katan, M. (1997). Regulation of inositol lipid-specific phospholipase c δ by changes in Ca²⁺ ion concentrations. *Biochem. J.* **327** (Pt 2), 545–552.
- Alshafie, W., Chappe, F.G., Li, M., Anini, Y., and Chappe, V.M. (2014). VIP regulates CFTR membrane expression and function in Calu-3 cells by increasing its interaction with NHERF1 and P-ERM in a VPAC1- and PKC ϵ -dependent manner. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **307**, C107–119.
- Ambort, D., Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Nilsson, H.E., Ermund, A., Johansson, B.R., Koeck, P.J.B., Hebert, H., and Hansson, G.C. (2012). Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 5645–5650.
- ANDERSEN, D.H. (1938). CYSTIC FIBROSIS OF THE PANCREAS AND ITS RELATION TO CELIAC DISEASE: A CLINICAL AND PATHOLOGIC STUDY. *American Journal of Diseases of Children* **56**, 344–399.
- Andersen, D.H., and Hodges, R.G. (1946). Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. *Am J Dis Child* **72**, 62–80.
- Anderson, M.P., Berger, H.A., Rich, D.P., Gregory, R.J., Smith, A.E., and Welsh, M.J. (1991). Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell* **67**, 775–784.
- Ando, T., Xiao, W., Gao, P., Namiranian, S., Matsumoto, K., Tomimori, Y., Hong, H., Yamashita, H., Kimura, M., Kashiwakura, J.-I., et al. (2014). Critical role for mast cell Stat5 activity in skin inflammation. *Cell Rep* **6**, 366–376.
- André-Grégoire, G., Dilasser, F., Chesné, J., Braza, F., Magnan, A., Loirand, G., and Sauzeau, V. (2017). Targeting of Rac1 prevents bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.*
- Anguita, E., and Villalobo, A. (2018). Ca²⁺ signaling and Src-kinases-controlled cellular functions. *Arch. Biochem. Biophys.* **650**, 59–74.
- Antigny, F., Norez, C., Cantereau, A., Becq, F., and Vandebrouck, C. (2008a). Abnormal spatial diffusion of Ca²⁺ in F508del-CFTR airway epithelial cells. *Respir. Res.* **9**, 70.
- Antigny, F., Norez, C., Becq, F., and Vandebrouck, C. (2008b). Calcium homeostasis is abnormal in cystic fibrosis airway epithelial cells but is normalized after rescue of F508del-CFTR. *Cell Calcium* **43**, 175–183.

- Antigny, F., Girardin, N., Raveau, D., Frieden, M., Becq, F., and Vandebrouck, C. (2009). Dysfunction of mitochondria Ca^{2+} uptake in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Mitochondrion* 9, 232–241.
- Antigny, F., Norez, C., Dannhoffer, L., Bertrand, J., Raveau, D., Corbi, P., Jayle, C., Becq, F., and Vandebrouck, C. (2011a). Transient receptor potential canonical channel 6 links Ca^{2+} mishandling to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel dysfunction in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 83–90.
- Antigny, F., Norez, C., Becq, F., and Vandebrouck, C. (2011b). CFTR and Ca Signaling in Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol* 2, 67.
- Antoni, F.A., Palkovits, M., Simpson, J., Smith, S.M., Leitch, A.L., Rosie, R., Fink, G., and Paterson, J.M. (1998). Ca^{2+} /calciueurin-inhibited adenylyl cyclase, highly abundant in forebrain regions, is important for learning and memory. *J. Neurosci.* 18, 9650–9661.
- Ao, M., Sarathy, J., Domingue, J., Alrefai, W.A., and Rao, M.C. (2013). Chenodeoxycholic acid stimulates Cl^{-} secretion via cAMP signaling and increases cystic fibrosis transmembrane conductance regulator phosphorylation in T84 cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 305, C447–456.
- Arispe, N., Rojas, E., Genge, B.R., Wu, L.N., and Wuthier, R.E. (1996). Similarity in calcium channel activity of annexin V and matrix vesicles in planar lipid bilayers. *Biophys. J.* 71, 1764–1775.
- Arora, K., Moon, C., Zhang, W., Yarlagadda, S., Penmatsa, H., Ren, A., Sinha, C., and Naren, A.P. (2014). Stabilizing rescued surface-localized δF508 CFTR by potentiation of its interaction with $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchanger regulatory factor 1. *Biochemistry* 53, 4169–4179.
- Avella, M., Loriol, C., Boulukos, K., Borgese, F., and Ehrenfeld, J. (2011). SLC26A9 stimulates CFTR expression and function in human bronchial cell lines. *J. Cell. Physiol.* 226, 212–223.
- Bae, Y.S., Cantley, L.G., Chen, C.S., Kim, S.R., Kwon, K.S., and Rhee, S.G. (1998). Activation of phospholipase C- γ by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 4465–4469.
- Bala, V., Rajagopal, S., Kumar, D.P., Nalli, A.D., Mahavadi, S., Sanyal, A.J., Grider, J.R., and Murthy, K.S. (2014). Release of GLP-1 and PYY in response to the activation of G protein-coupled bile acid receptor TGR5 is mediated by Epac/PLC- ϵ pathway and modulated by endogenous H_2S . *Front Physiol* 5, 420.
- Balázs, A., and Mall, M.A. (2018). Role of the SLC26A9 Chloride Channel as Disease Modifier and Potential Therapeutic Target in Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol* 9, 1112.
- Bale, S., Venkatesh, P., Sunkoju, M., and Godugu, C. (2018). An Adaptogen: Withaferin A Ameliorates in Vitro and in Vivo Pulmonary Fibrosis by Modulating the Interplay of Fibrotic, Matricellular Proteins, and Cytokines. *Front Pharmacol* 9, 248.
- Balghi, H., Robert, R., Rappaz, B., Zhang, X., Wohlhuter-Haddad, A., Evagelidis, A., Luo, Y., Goepp, J., Ferraro, P., Roméo, P., et al. (2011). Enhanced Ca^{2+} entry due to Orai1 plasma membrane insertion increases IL-8 secretion by cystic fibrosis airways. *FASEB J.* 25, 4274–4291.
- Bandorowicz-Pikuła, J., and Seliga, A.K. (2018). Annexin A6 as a cholesterol and nucleotide binding protein involved in membrane repair and in controlling membrane transport during endo- and exocytosis. *Postepy Biochem.* 64, 190–195.

- Barret, C., Roy, C., Montcourrier, P., Mangeat, P., and Niggli, V. (2000). Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. *J. Cell Biol.* *151*, 1067–1080.
- Bellis, G., Dehillotte, C., and Lemonnier, L. (2017). Registre Français de la mucoviscidose, bilan des données 2017.
- Benedetto, R., Ousingsawat, J., Wanitchakool, P., Zhang, Y., Holtzman, M.J., Amaral, M., Rock, J.R., Schreiber, R., and Kunzelmann, K. (2017). Epithelial Chloride Transport by CFTR Requires TMEM16A. *Sci Rep* *7*, 12397.
- Benedetto, R., Ousingsawat, J., Cabrita, I., Pinto, M., Lérias, J.R., Wanitchakool, P., Schreiber, R., and Kunzelmann, K. (2019). Plasma membrane-localized TMEM16 proteins are indispensable for expression of CFTR. *J. Mol. Med.* *97*, 711–722.
- Berger, H.A., Travis, S.M., and Welsh, M.J. (1993). Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* *268*, 2037–2047.
- Bertrand, C.A., Zhang, R., Pilewski, J.M., and Frizzell, R.A. (2009). SLC26A9 is a constitutively active, CFTR-regulated anion conductance in human bronchial epithelia. *J. Gen. Physiol.* *133*, 421–438.
- Bertrand, C.A., Mitra, S., Mishra, S.K., Wang, X., Zhao, Y., Pilewski, J.M., Madden, D.R., and Frizzell, R.A. (2017). The CFTR trafficking mutation F508del inhibits the constitutive activity of SLC26A9. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *312*, L912–L925.
- Bertrand, J., Dannhoffer, L., Antigny, F., Vachel, L., Jayle, C., Vandebrouck, C., Becq, F., and Norez, C. (2015). A functional tandem between transient receptor potential canonical channels 6 and calcium-dependent chloride channels in human epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* *765*, 337–345.
- Bezzetti, V., d'Adamo, P., Rimessi, A., Lanzara, C., Crovella, S., Nicolis, E., Tamanini, A., Athanasakis, E., Tebon, M., Bisoffi, G., et al. (2011). Phospholipase C-β3 is a key modulator of IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *J. Immunol.* *186*, 4946–4958.
- Bijli, K.M., Fazal, F., Slavin, S.A., Leonard, A., Grose, V., Alexander, W.B., Smrcka, A.V., and Rahman, A. (2016). Phospholipase C-ε signaling mediates endothelial cell inflammation and barrier disruption in acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *311*, L517–524.
- Billet, A., and Hanrahan, J.W. (2013). The secret life of CFTR as a calcium-activated chloride channel. *J. Physiol. (Lond.)* *591*, 5273–5278.
- Billet, A., Luo, Y., Balghi, H., and Hanrahan, J.W. (2013). Role of tyrosine phosphorylation in the muscarinic activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J. Biol. Chem.* *288*, 21815–21823.
- Billet, A., Jia, Y., Jensen, T., Riordan, J.R., and Hanrahan, J.W. (2015). Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator anion channel by tyrosine phosphorylation. *FASEB J.* *29*, 3945–3953.
- Borthwick, L.A., McGaw, J., Conner, G., Taylor, C.J., Gerke, V., Mehta, A., Robson, L., and Muimo, R. (2007). The formation of the cAMP/protein kinase A-dependent annexin 2-S100A10 complex with cystic fibrosis conductance regulator protein (CFTR) regulates CFTR channel function. *Mol. Biol. Cell* *18*, 3388–3397.

- Borthwick, L.A., Riemen, C., Goddard, C., Colledge, W.H., Mehta, A., Gerke, V., and Muimo, R. (2008a). Defective formation of PKA/CnA-dependent annexin 2-S100A10/CFTR complex in DeltaF508 cystic fibrosis cells. *Cell. Signal.* **20**, 1073–1083.
- Borthwick, L.A., Neal, A., Hobson, L., Gerke, V., Robson, L., and Muimo, R. (2008b). The annexin 2-S100A10 complex and its association with TRPV6 is regulated by cAMP/PKA/CnA in airway and gut epithelia. *Cell Calcium* **44**, 147–157.
- Boucher, R.C. (2002). An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 1359–1371.
- Boyer, J.L., Waldo, G.L., and Harden, T.K. (1992). Beta gamma-subunit activation of G-protein-regulated phospholipase C. *J. Biol. Chem.* **267**, 25451–25456.
- Bozoky, Z., Ahmadi, S., Milman, T., Kim, T.H., Du, K., Di Paola, M., Pasyk, S., Pekhletski, R., Keller, J.P., Bear, C.E., et al. (2017). Synergy of cAMP and calcium signaling pathways in CFTR regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E2086–E2095.
- Bretscher, A., Edwards, K., and Fehon, R.G. (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 586–599.
- Brisson, A., Mosser, G., and Huber, R. (1991). Structure of soluble and membrane-bound human annexin V. *J. Mol. Biol.* **220**, 199–203.
- Broadbent, D., Ahmadzai, M.M., Kammala, A.K., Yang, C., Occhiuto, C., Das, R., and Subramanian, H. (2017). Roles of NHERF Family of PDZ-Binding Proteins in Regulating GPCR Functions. *Adv. Immunol.* **136**, 353–385.
- Broere, N., Hillesheim, J., Tuo, B., Jorna, H., Houtsmuller, A.B., Shenolikar, S., Weinman, E.J., Donowitz, M., Seidler, U., de Jonge, H.R., et al. (2007). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activation is reduced in the small intestine of Na⁺/H⁺ exchanger 3 regulatory factor 1 (NHERF-1)- but Not NHERF-2-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **282**, 37575–37584.
- Brown, A., Danielsson, J., Townsend, E.A., Zhang, Y., Perez-Zoghbi, J.F., Emala, C.W., and Gallos, G. (2016). Attenuation of airway smooth muscle contractility via flavonol-mediated inhibition of phospholipase-C β . *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **310**, L747-758.
- Bryn, T., Mahic, M., Enserink, J.M., Schwede, F., Aandahl, E.M., and Taskén, K. (2006). The cyclic AMP-Epac1-Rap1 pathway is dissociated from regulation of effector functions in monocytes but acquires immunoregulatory function in mature macrophages. *J. Immunol.* **176**, 7361–7370.
- Bunney, T.D., Harris, R., Gandarillas, N.L., Josephs, M.B., Roe, S.M., Sorli, S.C., Paterson, H.F., Rodrigues-Lima, F., Esposito, D., Ponting, C.P., et al. (2006). Structural and mechanistic insights into ras association domains of phospholipase C epsilon. *Mol. Cell* **21**, 495–507.
- Burgoyne, R.D. (1988). Calpactin in exocytosis. *Nature* **331**, 20.
- Burnstock, G. (2012). Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays* **34**, 218–225.
- Buyck, J.M., Verriere, V., Benmahdi, R., Higgins, G., Guery, B., Matran, R., Harvey, B.J., Faure, K., and Urbach, V. (2013). P. aeruginosa LPS stimulates calcium signaling and chloride secretion via CFTR in human bronchial epithelial cells. *J. Cyst. Fibros.* **12**, 60–67.

- Cali, J.J., Zwaagstra, J.C., Mons, N., Cooper, D.M., and Krupinski, J. (1994). Type VIII adenylyl cyclase. A Ca^{2+} /calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. *J. Biol. Chem.* 269, 12190–12195.
- Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P.J., and Gierschik, P. (1992). Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature* 360, 684–686.
- Chap, H., Fauvel, J., Gassama-Diagne, A., Ragab-Thomas, J., and Simon, M.-F. (1991). Une homologie frappante entre le CFTR et les annexines. *Med.Sci.* 7,8-9.
- Chappe, F., Loewen, M.E., Hanrahan, J.W., and Chappe, V. (2008). Vasoactive intestinal peptide increases cystic fibrosis transmembrane conductance regulator levels in the apical membrane of Calu-3 cells through a protein kinase C-dependent mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327, 226–238.
- Chappe, V., Hinkson, D.A., Zhu, T., Chang, X.-B., Riordan, J.R., and Hanrahan, J.W. (2003). Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA. *J. Physiol. (Lond.)* 548, 39–52.
- Chappe, V., Hinkson, D.A., Howell, L.D., Evagelidis, A., Liao, J., Chang, X.-B., Riordan, J.R., and Hanrahan, J.W. (2004). Stimulatory and inhibitory protein kinase C consensus sequences regulate the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 390–395.
- Chattopadhyay, A., Vecchi, M., Ji, Q. s, Mernaugh, R., and Carpenter, G. (1999). The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C-gamma1 with the activated EGF receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 26091–26097.
- Chen, C.C., Sun, Y.T., Chen, J.J., and Chiu, K.T. (2000). TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression in human lung epithelial cells: involvement of the phospholipase C-gamma 2, protein kinase C-alpha, tyrosine kinase, NF-kappa B-inducing kinase, and I-kappa B kinase 1/2 pathway. *J. Immunol.* 165, 2719–2728.
- Chen, X., Li, X.-M., Gu, W., Wang, D., Chen, Y., and Guo, X.-J. (2017). LAT alleviates Th2/Treg imbalance in an OVA-induced allergic asthma mouse model through LAT-PLC- γ 1 interaction. *Int. Immunopharmacol.* 44, 9–15.
- Chen, Y., Wang, X., Di, L., Fu, G., Chen, Y., Bai, L., Liu, J., Feng, X., McDonald, J.M., Michalek, S., et al. (2008). Phospholipase Cgamma2 mediates RANKL-stimulated lymph node organogenesis and osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* 283, 29593–29601.
- Chin, D., and Means, A.R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* 10, 322–328.
- Clancy, J.P., Szczesniak, R.D., Ashlock, M.A., Ernst, S.E., Fan, L., Hornick, D.B., Karp, P.H., Khan, U., Lymp, J., Ostmann, A.J., et al. (2013). Multicenter intestinal current measurements in rectal biopsies from CF and non-CF subjects to monitor CFTR function. *PLoS ONE* 8, e73905.
- Cohn, R.C., Poncz, L., Waller, R.L., and Dearborn, D.G. (1988). Phosphoinositide content of erythrocyte membranes in cystic fibrosis. *J. Lab. Clin. Med.* 111, 336–340.
- Conner, G.E., Ivonnet, P., Gelin, M., Whitney, P., and Salathe, M. (2013). H_2O_2 stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through an autocrine prostaglandin pathway, using multidrug-resistant protein-4. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49, 672–679.

- Cozens, A.L., Yezzi, M.J., Kunzelmann, K., Ohrui, T., Chin, L., Eng, K., Finkbeiner, W.E., Widdicombe, J.H., and Gruenert, D.C. (1994). CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *10*, 38–47.
- Cullere, X., Shaw, S.K., Andersson, L., Hirahashi, J., Lusinskas, F.W., and Mayadas, T.N. (2005). Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood* *105*, 1950–1955.
- Cumbay, M.G., and Watts, V.J. (2005). Galphaq potentiation of adenylate cyclase type 9 activity through a Ca²⁺/calmodulin-dependent pathway. *Biochem. Pharmacol.* *69*, 1247–1256.
- Dahan, D., Evagelidis, A., Hanrahan, J.W., Hinkson, D.A., Jia, Y., Luo, J., and Zhu, T. (2001). Regulation of the CFTR channel by phosphorylation. *Pflugers Arch.* *443 Suppl 1*, S92-96.
- Daniels, R.L., Takashima, Y., and McKemy, D.D. (2009). Activity of the neuronal cold sensor TRPM8 is regulated by phospholipase C via the phospholipid phosphoinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* *284*, 1570–1582.
- Davies, J.C. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Paediatr Respir Rev* *3*, 128–134.
- Davis, P.B. (2006). Cystic fibrosis since 1938. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *173*, 475–482.
- De Boeck, K., Zolin, A., Cuppens, H., Olesen, H.V., and Viviani, L. (2014). The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* *13*, 403–409.
- Denning, G.M., Anderson, M.P., Amara, J.F., Marshall, J., Smith, A.E., and Welsh, M.J. (1992). Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* *358*, 761–764.
- Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* *443*, 651–657.
- Domingue, J.C., Ao, M., Sarathy, J., and Rao, M.C. (2016). Chenodeoxycholic acid requires activation of EGFR, EPAC, and Ca²⁺ to stimulate CFTR-dependent Cl⁻ secretion in human colonic T84 cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *311*, C777–C792.
- Donaldson, J.G. (2015). Immunofluorescence Staining. *Curr Protoc Cell Biol* *69*, 4.3.1-7.
- Donaldson, S.H., and Boucher, R.C. (2007). Sodium channels and cystic fibrosis. *Chest* *132*, 1631–1636.
- vom Dorp, F., Sari, A.Y., Sanders, H., Keiper, M., Oude Weernink, P.A., Jakobs, K.H., and Schmidt, M. (2004). Inhibition of phospholipase C-epsilon by Gi-coupled receptors. *Cell. Signal.* *16*, 921–928.
- Dunn, H.A., and Ferguson, S.S.G. (2015). PDZ Protein Regulation of G Protein-Coupled Receptor Trafficking and Signaling Pathways. *Mol. Pharmacol.* *88*, 624–639.
- Dusaban, S.S., Purcell, N.H., Rockenstein, E., Masliah, E., Cho, M.K., Smrcka, A.V., and Brown, J.H. (2013). Phospholipase C epsilon links G protein-coupled receptor activation to inflammatory astrocytic responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 3609–3614.

- Dusaban, S.S., Kunkel, M.T., Smrcka, A.V., and Brown, J.H. (2015). Thrombin promotes sustained signaling and inflammatory gene expression through the CDC25 and Ras-associating domains of phospholipase C ϵ . *J. Biol. Chem.* 290, 26776–26783.
- Dutta, A.K., Woo, K., Doctor, R.B., Fitz, J.G., and Feranchak, A.P. (2008). Extracellular nucleotides stimulate Cl⁻ currents in biliary epithelia through receptor-mediated IP₃ and Ca²⁺ release. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295, G1004-1015.
- Ehrhardt, C., Collnot, E.-M., Baldes, C., Becker, U., Laue, M., Kim, K.-J., and Lehr, C.-M. (2006). Towards an in vitro model of cystic fibrosis small airway epithelium: characterisation of the human bronchial epithelial cell line CFBE41o-. *Cell and Tissue Research* 323, 405–415.
- Elborn, J.S. (2016). Cystic fibrosis. *Lancet* 388, 2519–2531.
- Essen, L.O., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M., and Williams, R.L. (1996). Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. *Nature* 380, 595–602.
- Evellin, S., Nolte, J., Tysack, K., vom Dorp, F., Thiel, M., Weernink, P.A.O., Jakobs, K.H., Webb, E.J., Lomasney, J.W., and Schmidt, M. (2002). Stimulation of phospholipase C-epsilon by the M3 muscarinic acetylcholine receptor mediated by cyclic AMP and the GTPase Rap2B. *J. Biol. Chem.* 277, 16805–16813.
- Exton, J.H. (1996). Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 481–509.
- Fain, J.N., and Berridge, M.J. (1979). Relationship between hormonal activation of phosphatidylinositol hydrolysis, fluid secretion and calcium flux in the blowfly salivary gland. *Biochem. J.* 178, 45–58.
- Falasca, M., Logan, S.K., Lehto, V.P., Baccante, G., Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (1998). Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J.* 17, 414–422.
- Favia, M., Guerra, L., Fanelli, T., Cardone, R.A., Monterisi, S., Di Sole, F., Castellani, S., Chen, M., Seidler, U., Reshkin, S.J., et al. (2010). Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 overexpression-dependent increase of cytoskeleton organization is fundamental in the rescue of F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human airway CFBE41o- cells. *Mol. Biol. Cell* 21, 73–86.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Fischer, H., and Machen, T.E. (1996). The tyrosine kinase p60c-src regulates the fast gate of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Biophys. J.* 71, 3073–3082.
- Fleet, A., Ashworth, R., Kubista, H., Edwards, H., Bolsover, S., Mobbs, P., and Moss, S.E. (1999). Inhibition of EGF-dependent calcium influx by annexin VI is splice form-specific. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 540–546.
- Forstner, J.F., and Forstner, G.G. (1975). Calcium binding to intestinal goblet cell mucin. *Biochim. Biophys. Acta* 386, 283–292.
- Froux, L., Billet, A., and Becq, F. (2018). Modulating the cystic fibrosis transmembrane regulator and the development of new precision drugs. *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development* 3, 357–370.

- Froux, L., Coraux, C., Sage, E., and Becq, F. (2019). Short-term consequences of F508del-CFTR thermal instability on CFTR-dependent transepithelial currents in human airway epithelial cells. *Sci Rep* 9, 13729.
- Fu, G., Chen, Y., Yu, M., Podd, A., Schuman, J., He, Y., Di, L., Yassai, M., Haribhai, D., North, P.E., et al. (2010). Phospholipase C γ 1 is essential for T cell development, activation, and tolerance. *J. Exp. Med.* 207, 309–318.
- Fukami, K., Yoshida, M., Inoue, T., Kurokawa, M., Fissore, R.A., Yoshida, N., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. (2003). Phospholipase C δ 4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J. Cell Biol.* 161, 79–88.
- Gabel, M., Delavoie, F., Demais, V., Royer, C., Bailly, Y., Vitale, N., Bader, M.-F., and Chasserot-Golaz, S. (2015). Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. *J. Cell Biol.* 210, 785–800.
- Gadsby, D.C., and Nairn, A.C. (1999). Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol. Rev.* 79, S77–S107.
- Gees, M., Colasoul, B., and Nilius, B. (2010). The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003962.
- Gerke, V., and Moss, S.E. (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev.* 82, 331–371.
- Golczak, M., Kicinska, A., Bendorowicz-Pikula, J., Buchet, R., Szewczyk, A., and Pikula, S. (2001). Acidic pH-induced folding of annexin VI is a prerequisite for its insertion into lipid bilayers and formation of ion channels by the protein molecules. *FASEB J.* 15, 1083–1085.
- van de Graaf, S.F.J., Hoenderop, J.G.J., Gkika, D., Lamers, D., Prenen, J., Rescher, U., Gerke, V., Staub, O., Nilius, B., and Bindels, R.J.M. (2003). Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J.* 22, 1478–1487.
- Grebert, C., Becq, F., and Vandebrouck, C. (2019). Focus on TRP channels in cystic fibrosis. *Cell Calcium* 81, 29–37.
- Gresset, A., Hicks, S.N., Harden, T.K., and Sondek, J. (2010). Mechanism of phosphorylation-induced activation of phospholipase C-gamma isozymes. *J. Biol. Chem.* 285, 35836–35847.
- Gresset, A., Sondek, J., and Harden, T.K. (2012). The phospholipase C isozymes and their regulation. *Subcell. Biochem.* 58, 61–94.
- Grobler, J.A., and Hurley, J.H. (1998). Catalysis by phospholipase C δ 1 requires that Ca²⁺ bind to the catalytic domain, but not the C2 domain. *Biochemistry* 37, 5020–5028.
- Gu, C., and Cooper, D.M. (1999). Calmodulin-binding sites on adenylyl cyclase VIII. *J. Biol. Chem.* 274, 8012–8021.
- Guggino, W.B., and Stanton, B.A. (2006). New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 426–436.
- Gustafsson, J.K., Ermund, A., Ambort, D., Johansson, M.E.V., Nilsson, H.E., Thorell, K., Hebert, H., Sjövall, H., and Hansson, G.C. (2012). Bicarbonate and functional CFTR channel are required for proper mucin secretion and link cystic fibrosis with its mucus phenotype. *J. Exp. Med.* 209, 1263–1272.

- Hall, R.A., Ostedgaard, L.S., Premont, R.T., Blitzer, J.T., Rahman, N., Welsh, M.J., and Lefkowitz, R.J. (1998). A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 8496–8501.
- Hallows, K.R., Raghuram, V., Kemp, B.E., Witters, L.A., and Foskett, J.K. (2000). Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by novel interaction with the metabolic sensor AMP-activated protein kinase. *J. Clin. Invest.* **105**, 1711–1721.
- Hallows, K.R., Kobinger, G.P., Wilson, J.M., Witters, L.A., and Foskett, J.K. (2003). Physiological modulation of CFTR activity by AMP-activated protein kinase in polarized T84 cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **284**, C1297–1308.
- Halls, M.L., and Cooper, D.M.F. (2011). Regulation by Ca²⁺-signaling pathways of adenylyl cyclases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a004143.
- Hao, J.-J., Liu, Y., Kruhlak, M., Debell, K.E., Rellahan, B.L., and Shaw, S. (2009). Phospholipase C-mediated hydrolysis of PIP2 releases ERM proteins from lymphocyte membrane. *J. Cell Biol.* **184**, 451–462.
- Hashimoto, A., Takeda, K., Inaba, M., Sekimata, M., Kaisho, T., Ikehara, S., Homma, Y., Akira, S., and Kurosaki, T. (2000). Cutting edge: essential role of phospholipase C-gamma 2 in B cell development and function. *J. Immunol.* **165**, 1738–1742.
- Helms, M.N., Chen, X.-J., Ramosevac, S., Eaton, D.C., and Jain, L. (2006). Dopamine regulation of amiloride-sensitive sodium channels in lung cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **290**, L710–L722.
- Henderson, A.G., Ehre, C., Button, B., Abdullah, L.H., Cai, L.-H., Leigh, M.W., DeMaria, G.C., Matsui, H., Donaldson, S.H., Davis, C.W., et al. (2014). Cystic fibrosis airway secretions exhibit mucin hyperconcentration and increased osmotic pressure. *J. Clin. Invest.* **124**, 3047–3060.
- Henry, C.O., Dalloneau, E., Pérez-Berezo, M.-T., Plata, C., Wu, Y., Guillon, A., Morello, E., Aimar, R.-F., Potier-Cartereau, M., Esnard, F., et al. (2016). In vitro and in vivo evidence for an inflammatory role of the calcium channel TRPV4 in lung epithelium: Potential involvement in cystic fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **311**, L664–675.
- Hicks, S.N., Jezyk, M.R., Gershburg, S., Seifert, J.P., Harden, T.K., and Sondek, J. (2008). General and versatile autoinhibition of PLC isozymes. *Mol. Cell* **31**, 383–394.
- Hilgemann, D.W., and Ball, R. (1996). Regulation of Cardiac Na⁺/Ca²⁺ Exchange and KATP Potassium Channels by PIP2. *Science* **273**, 956–959.
- Himmel, B., and Nagel, G. (2004). Protein kinase-independent activation of CFTR by phosphatidylinositol phosphates. *EMBO Reports* **5**, 85–90.
- Hofmann, S.L., and Majerus, P.W. (1982). Identification and properties of two distinct phosphatidylinositol-specific phospholipase C enzymes from sheep seminal vesicular glands. *J. Biol. Chem.* **257**, 6461–6469.
- Holcomb, J., Jiang, Y., Lu, G., Trescott, L., Brunzelle, J., Sirinupong, N., Li, C., Naren, A.P., and Yang, Z. (2014). Structural insights into PDZ-mediated interaction of NHERF2 and LPA(2), a cellular event implicated in CFTR channel regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 399–403.

- Holgate, S.T. (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat. Med.* **18**, 673–683.
- Homma, Y., Takenawa, T., Emori, Y., Sorimachi, H., and Suzuki, K. (1989). Tissue- and cell type-specific expression of mRNAs for four types of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 406–412.
- Hoque, K.M., Woodward, O.M., van Rossum, D.B., Zachos, N.C., Chen, L., Leung, G.P.H., Guggino, W.B., Guggino, S.E., and Tse, C.-M. (2010). Epac1 mediates protein kinase A-independent mechanism of forskolin-activated intestinal chloride secretion. *J. Gen. Physiol.* **135**, 43–58.
- Hu, L., Edamatsu, H., Takenaka, N., Ikuta, S., and Kataoka, T. (2010). Crucial role of phospholipase Cepsilon in induction of local skin inflammatory reactions in the elicitation stage of allergic contact hypersensitivity. *J. Immunol.* **184**, 993–1002.
- Hu, N.-J., Bradshaw, J., Lauter, H., Buckingham, J., Solito, E., and Hofmann, A. (2008). Membrane-induced folding and structure of membrane-bound annexin A1 N-terminal peptides: implications for annexin-induced membrane aggregation. *Biophys. J.* **94**, 1773–1781.
- Huang, C.L., Feng, S., and Hilgemann, D.W. (1998). Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* **391**, 803–806.
- Huang, W., Li, M.-L., Xia, M.-Y., and Shao, J.-Y. (2018). Fisetin-treatment alleviates airway inflammation through inhibition of MyD88/NF-κB signaling pathway. *Int. J. Mol. Med.* **42**, 208–218.
- Huang, W., Zeng, J., Liu, Z., Su, M., Li, Q., and Zhu, B. (2019). Acetylshikonin stimulates glucose uptake in L6 myotubes via a PLC-β3/PKCδ-dependent pathway. *Biomed. Pharmacother.* **112**, 108588.
- Huguet, F., Calvez, M.L., Benz, N., Le Hir, S., Mignen, O., Buscaglia, P., Horgen, F.D., Férec, C., Kerbiriou, M., and Trouvé, P. (2016). Function and regulation of TRPM7, as well as intracellular magnesium content, are altered in cells expressing ΔF508-CFTR and G551D-CFTR. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 3351–3373.
- Hwang, J.I., Heo, K., Shin, K.J., Kim, E., Yun, C., Ryu, S.H., Shin, H.S., and Suh, P.G. (2000a). Regulation of phospholipase C-beta 3 activity by Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2. *J. Biol. Chem.* **275**, 16632–16637.
- Hwang, J.-I., Oh, Y.-S., Shin, K.-J., Kim, H., Ryu, S.H., and Suh, P.-G. (2005a). Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC-eta. *Biochem. J.* **389**, 181–186.
- Hwang, J.-I., Kim, H.S., Lee, J.R., Kim, E., Ryu, S.H., and Suh, P.-G. (2005b). The interaction of phospholipase C-beta3 with Shank2 regulates mGluR-mediated calcium signal. *J. Biol. Chem.* **280**, 12467–12473.
- Hwang, T.H., Lee, H.J., Lee, N.K., and Choi, Y.C. (2000b). Evidence for basolateral but not apical membrane localization of outwardly rectifying depolarization-induced Cl(-) channel in airway epithelia. *J. Membr. Biol.* **176**, 217–221.
- Illenberger, D., Schwald, F., Pimmer, D., Binder, W., Maier, G., Dietrich, A., and Gierschik, P. (1998). Stimulation of phospholipase C-beta2 by the Rho GTPases Cdc42Hs and Rac1. *EMBO J.* **17**, 6241–6249.
- Isas, J.M., Cartailier, J.P., Sokolov, Y., Patel, D.R., Langen, R., Luecke, H., Hall, J.E., and Haigler, H.T. (2000). Annexins V and XII insert into bilayers at mildly acidic pH and form ion channels. *Biochemistry* **39**, 3015–3022.

- Ivonnet, P., Salathe, M., and Conner, G.E. (2015). Hydrogen peroxide stimulation of CFTR reveals an Epac-mediated, soluble AC-dependent cAMP amplification pathway common to GPCR signalling. *Br. J. Pharmacol.* 172, 173–184.
- Jayaraman, S., Joo, N.S., Reitz, B., Wine, J.J., and Verkman, A.S. (2001). Submucosal gland secretions in airways from cystic fibrosis patients have normal [Na(+)] and pH but elevated viscosity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8119–8123.
- Jhon, D.Y., Lee, H.H., Park, D., Lee, C.W., Lee, K.H., Yoo, O.J., and Rhee, S.G. (1993). Cloning, sequencing, purification, and Gq-dependent activation of phospholipase C-beta 3. *J. Biol. Chem.* 268, 6654–6661.
- Jia, Y., Mathews, C.J., and Hanrahan, J.W. (1997). Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 272, 4978–4984.
- Jiang, H., Kuang, Y., Wu, Y., Xie, W., Simon, M.I., and Wu, D. (1997). Roles of phospholipase C beta2 in chemoattractant-elicited responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7971–7975.
- Jiang, Y., Wang, S., Holcomb, J., Trescott, L., Guan, X., Hou, Y., Brunzelle, J., Sirinupong, N., Li, C., and Yang, Z. (2014). Crystallographic analysis of NHERF1-PLCβ3 interaction provides structural basis for CXCR2 signaling in pancreatic cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 638–643.
- Jin, T.G., Satoh, T., Liao, Y., Song, C., Gao, X., Kariya, K., Hu, C.D., and Kataoka, T. (2001). Role of the CDC25 homology domain of phospholipase Cepsilon in amplification of Rap1-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 30301–30307.
- Jovov, B., Ismailov, I.I., and Benos, D.J. (1995a). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is required for protein kinase A activation of an outwardly rectified anion channel purified from bovine tracheal epithelia. *J. Biol. Chem.* 270, 1521–1528.
- Jovov, B., Ismailov, I.I., Berdiev, B.K., Fuller, C.M., Sorscher, E.J., Dedman, J.R., Kaetzel, M.A., and Benos, D.J. (1995b). Interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and outwardly rectified chloride channels. *J. Biol. Chem.* 270, 29194–29200.
- Kanemaru, K., Nakahara, M., Nakamura, Y., Hashiguchi, Y., Kouchi, Z., Yamaguchi, H., Oshima, N., Kiyonari, H., and Fukami, K. (2010). Phospholipase C-eta2 is highly expressed in the habenula and retina. *Gene Expr. Patterns* 10, 119–126.
- Kanemaru, K., Nakamura, Y., Sato, K., Kojima, R., Takahashi, S., Yamaguchi, M., Ichinohe, M., Kiyonari, H., Shioi, G., Kabashima, K., et al. (2012). Epidermal phospholipase Cδ1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin-17 levels in mice. *Nat Commun* 3, 963.
- Kang, G., Chepurny, O.G., Malester, B., Rindler, M.J., Rehmann, H., Bos, J.L., Schwede, F., Coetzee, W.A., and Holz, G.G. (2006). cAMP sensor Epac as a determinant of ATP-sensitive potassium channel activity in human pancreatic beta cells and rat INS-1 cells. *J. Physiol. (Lond.)* 573, 595–609.
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E., and Graybiel, A.M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282, 2275–2279.
- Kelley, G.G., Reks, S.E., Ondrako, J.M., and Smrcka, A.V. (2001). Phospholipase C(epsilon): a novel Ras effector. *EMBO J.* 20, 743–754.

- Kelley, G.G., Reks, S.E., and Smrcka, A.V. (2004). Hormonal regulation of phospholipase Cepsilon through distinct and overlapping pathways involving G12 and Ras family G-proteins. *Biochem. J.* 378, 129–139.
- Kim, J.K., Choi, J.W., Lim, S., Kwon, O., Seo, J.K., Ryu, S.H., and Suh, P.-G. (2011a). Phospholipase C- η 1 is activated by intracellular Ca(2+) mobilization and enhances GPCRs/PLC/Ca(2+) signaling. *Cell. Signal.* 23, 1022–1029.
- Kim, J.K., Lim, S., Kim, J., Kim, S., Kim, J.H., Ryu, S.H., and Suh, P.-G. (2011b). Subtype-specific roles of phospholipase C- β via differential interactions with PDZ domain proteins. *Adv. Enzyme Regul.* 51, 138–151.
- Kim, J.Y., Han, W., Namkung, W., Lee, J.H., Kim, K.H., Shin, H., Kim, E., and Lee, M.G. (2004). Inhibitory regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator anion-transporting activities by Shank2. *J. Biol. Chem.* 279, 10389–10396.
- Kim, M.J., Si, F., Kim, S.J., Hong, S.B., Hwang, J.I., Lee, H.J., Lee, S.J., Chang, J.S., Lee, Y.H., Ryu, S.H., et al. (1999a). The SH2-SH2-SH3 domain of phospholipase C-gamma1 directly binds to translational elongation factor-1alpha. *Mol. Cells* 9, 631–637.
- Kim, Y.H., Park, T.J., Lee, Y.H., Baek, K.J., Suh, P.G., Ryu, S.H., and Kim, K.T. (1999b). Phospholipase C-delta1 is activated by capacitative calcium entry that follows phospholipase C-beta activation upon bradykinin stimulation. *J. Biol. Chem.* 274, 26127–26134.
- Kiuru, M., Kurban, M., Itoh, M., Petukhova, L., Shimomura, Y., Wajid, M., and Christiano, A.M. (2011). Hereditary leukonychia, or porcelain nails, resulting from mutations in PLCD1. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 839–844.
- König, J., and Gerke, V. (2000). Modes of annexin-membrane interactions analyzed by employing chimeric annexin proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1498, 174–180.
- Konstas, A.-A., Koch, J.-P., Tucker, S.J., and Korbmayer, C. (2002). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent up-regulation of Kir1.1 (ROMK) renal K+ channels by the epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* 277, 25377–25384.
- Kouchi, Z., Fukami, K., Shikano, T., Oda, S., Nakamura, Y., Takenawa, T., and Miyazaki, S. (2004). Recombinant phospholipase C-zeta has high Ca2+ sensitivity and induces Ca2+ oscillations in mouse eggs. *J. Biol. Chem.* 279, 10408–10412.
- Kreda, S.M., Davis, C.W., and Rose, M.C. (2012). CFTR, mucins, and mucus obstruction in cystic fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a009589.
- Kunzelmann, K., and Mehta, A. (2013). CFTR: a hub for kinases and crosstalk of cAMP and Ca2+. *FEBS J.* 280, 4417–4429.
- Kunzelmann, K., Mall, M., Briel, M., Hipper, A., Nitschke, R., Ricken, S., and Greger, R. (1997). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator attenuates the endogenous Ca2+ activated Cl-conductance of Xenopus oocytes. *Pflügers Arch.* 435, 178–181.
- Kunzelmann, K., Ousingsawat, J., Cabrita, I., Doušová, T., Bähr, A., Janda, M., Schreiber, R., and Benedetto, R. (2019). TMEM16A in Cystic Fibrosis: Activating or Inhibiting? *Front Pharmacol* 10, 3.

- Le Drévo, M.-A., Benz, N., Kerbiriou, M., Giroux-Metges, M.-A., Pennec, J.-P., Trouvé, P., and Férec, C. (2008). Annexin A5 increases the cell surface expression and the chloride channel function of the DeltaF508-cystic fibrosis transmembrane regulator. *Biochim. Biophys. Acta* 1782, 605–614.
- Lee, K., and Yoon, S.S. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 1053–1064.
- Lee, R.J., and Foskett, J.K. (2010). Mechanisms of Ca²⁺-stimulated fluid secretion by porcine bronchial submucosal gland serous acinar cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 298, L210–231.
- Lee, R.J., and Foskett, J.K. (2014). Ca²⁺ signaling and fluid secretion by secretory cells of the airway epithelium. *Cell Calcium* 55, 325–336.
- Lee, C.W., Lee, K.H., Lee, S.B., Park, D., and Rhee, S.G. (1994). Regulation of phospholipase C-beta 4 by ribonucleotides and the alpha subunit of Gq. *J. Biol. Chem.* 269, 25335–25338.
- Lee, J.H., Richter, W., Namkung, W., Kim, K.H., Kim, E., Conti, M., and Lee, M.G. (2007a). Dynamic regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by competitive interactions of molecular adaptors. *J. Biol. Chem.* 282, 10414–10422.
- Lee, R.J., Limberis, M.P., Hennessy, M.F., Wilson, J.M., and Foskett, J.K. (2007b). Optical imaging of Ca²⁺-evoked fluid secretion by murine nasal submucosal gland serous acinar cells. *J. Physiol. (Lond.)* 582, 1099–1124.
- Lemonnier, L., Trebak, M., and Putney, J.W. (2008). Complex regulation of the TRPC3, 6 and 7 channel subfamily by diacylglycerol and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Cell Calcium* 43, 506–514.
- Lennernäs, H. (2007). Animal data: the contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 1103–1120.
- Lérias, J., Pinto, M., Benedetto, R., Schreiber, R., Amaral, M., Aureli, M., and Kunzelmann, K. (2018). Compartmentalized crosstalk of CFTR and TMEM16A (ANO1) through EPAC1 and ADCY1. *Cell. Signal.* 44, 10–19.
- Lévêque, M., Le Trionnaire, S., Del Porto, P., and Martin-Chouly, C. (2017). The impact of impaired macrophage functions in cystic fibrosis disease progression. *J. Cyst. Fibros.* 16, 443–453.
- Lévêque, M., Penna, A., Le Trionnaire, S., Belleguic, C., Desrues, B., Brinchault, G., Jouneau, S., Lagadic-Gossman, D., and Martin-Chouly, C. (2018). Phagocytosis depends on TRPV2-mediated calcium influx and requires TRPV2 in lipids rafts: alteration in macrophages from patients with cystic fibrosis. *Sci Rep* 8, 4310.
- Li, M., Li, Q., Yang, G., Kolosov, V.P., Perelman, J.M., and Zhou, X.D. (2011). Cold temperature induces mucin hypersecretion from normal human bronchial epithelial cells in vitro through a transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-mediated mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 626–634.e1–5.
- Li, Z., Jiang, H., Xie, W., Zhang, Z., Smrcka, A.V., and Wu, D. (2000). Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* 287, 1046–1049.
- Liao, H.-J., Kume, T., McKay, C., Xu, M.-J., Ihle, J.N., and Carpenter, G. (2002). Absence of erythropoiesis and vasculogenesis in Plcg1-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 277, 9335–9341.

- Liedtke, C.M., and Cole, T.S. (1998). Antisense oligonucleotide to PKC-epsilon alters cAMP-dependent stimulation of CFTR in Calu-3 cells. *Am. J. Physiol.* 275, C1357-1364.
- Liedtke, C.M., and Cole, T.S. (2000). PKC signaling in CF/T43 cell line: regulation of NKCC1 by PKC-delta isotype. *Biochim. Biophys. Acta* 1495, 24–33.
- Liedtke, C.M., Cody, D., and Cole, T.S. (2001). Differential regulation of Cl⁻ transport proteins by PKC in Calu-3 cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280, L739-747.
- Lim, W.G., Tan, B.J., Zhu, Y., Zhou, S., Armstrong, J.S., Li, Q.T., Dong, Q., Chan, E., Smith, D., Verma, C., et al. (2006). The very C-terminus of PRK1/PKN is essential for its activation by RhoA and downstream signaling. *Cell. Signal.* 18, 1473–1481.
- Lin, F.G., Cheng, H.F., Lee, I.F., Kao, H.J., Loh, S.H., and Lee, W.H. (2001). Downregulation of phospholipase C delta3 by cAMP and calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 274–280.
- Lishko, P.V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C.B., and Gaudet, R. (2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54, 905–918.
- Litosch, I. (2002). Novel mechanisms for feedback regulation of phospholipase C-beta activity. *IUBMB Life* 54, 253–260.
- Litvak, V., Tian, D., Shaul, Y.D., and Lev, S. (2000). Targeting of PYK2 to focal adhesions as a cellular mechanism for convergence between integrins and G protein-coupled receptor signaling cascades. *J. Biol. Chem.* 275, 32736–32746.
- Liu, F., Zhang, Z., Csanády, L., Gadsby, D.C., and Chen, J. (2017). Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel. *Cell* 169, 85-95.e8.
- Liu, Y., Myrvang, H.K., and Dekker, L.V. (2015a). Annexin A2 complexes with S100 proteins: structure, function and pharmacological manipulation: Annexin A2-S100 complexes. *British Journal of Pharmacology* 172, 1664–1676.
- Liu, Y.-N., Zha, W.-J., Ma, Y., Chen, F.-F., Zhu, W., Ge, A., Zeng, X.-N., and Huang, M. (2015b). Galangin attenuates airway remodelling by inhibiting TGF-β1-mediated ROS generation and MAPK/Akt phosphorylation in asthma. *Sci Rep* 5, 11758.
- Lobo, M.J., Amaral, M.D., Zaccolo, M., and Farinha, C.M. (2016). EPAC1 activation by cAMP stabilizes CFTR at the membrane by promoting its interaction with NHERF1. *J. Cell. Sci.* 129, 2599–2612.
- Locher, K.P. (2016). Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 487–493.
- Lohi, H., Kujala, M., Makela, S., Lehtonen, E., Kestila, M., Saarialho-Kere, U., Markovich, D., and Kere, J. (2002). Functional characterization of three novel tissue-specific anion exchangers SLC26A7, -A8, and -A9. *J. Biol. Chem.* 277, 14246–14254.
- Lopez, I., Mak, E.C., Ding, J., Hamm, H.E., and Lomasney, J.W. (2001). A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by Galpha 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 2758–2765.

- López-Rodríguez, J.C., Martínez-Carmona, F.J., Rodríguez-Crespo, I., Lizarbe, M.A., and Turnay, J. (2018). Molecular dissection of the membrane aggregation mechanisms induced by monomeric annexin A2. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1865, 863–873.
- Lu, P., Boros, S., Chang, Q., Bindels, R.J., and Hoenderop, J.G. (2008). The beta-glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23, 3397–3402.
- Lukacs, V., Thyagarajan, B., Varnai, P., Balla, A., Balla, T., and Rohacs, T. (2007). Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J. Neurosci.* 27, 7070–7080.
- Lukacs, V., Yudin, Y., Hammond, G.R., Sharma, E., Fukami, K., and Rohacs, T. (2013). Distinctive changes in plasma membrane phosphoinositides underlie differential regulation of TRPV1 in nociceptive neurons. *J. Neurosci.* 33, 11451–11463.
- Luo, J., Pato, M.D., Riordan, J.R., and Hanrahan, J.W. (1998). Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases. *Am. J. Physiol.* 274, C1397-1410.
- Luttrell, D.K., and Luttrell, L.M. (2004). Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. *Oncogene* 23, 7969–7978.
- Maganti, L., Ghosh, M., and Chakrabarti, J. (2018). Molecular dynamics studies on conformational thermodynamics of Orai1–calmodulin complex. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 36, 3411–3419.
- Magni, G., and Ceruti, S. (2013). P2Y purinergic receptors: new targets for analgesic and antimigraine drugs. *Biochem. Pharmacol.* 85, 466–477.
- Mall, M.A., and Galiotta, L.J.V. (2015). Targeting ion channels in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 14, 561–570.
- Mall, M., Hipper, A., Greger, R., and Kunzelmann, K. (1996). Wild type but not deltaF508 CFTR inhibits Na⁺ conductance when coexpressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* 381, 47–52.
- Mall, M., Hirtz, S., Gonska, T., and Kunzelmann, K. (2004). Assessment of CFTR function in rectal biopsies for the diagnosis of cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 3 Suppl 2, 165–169.
- Margolis, B., Zilberstein, A., Franks, C., Felder, S., Kremer, S., Ullrich, A., Rhee, S.G., Skorecki, K., and Schlessinger, J. (1990). Effect of phospholipase C-gamma overexpression on PDGF-induced second messengers and mitogenesis. *Science* 248, 607–610.
- Martin, C., Jacobi, J.S., Nava, G., Jeziorski, M.C., Clapp, C., and Martínez de la Escalera, G. (2007). GABA inhibition of cyclic AMP production in immortalized GnRH neurons is mediated by calcineurin-dependent dephosphorylation of adenylyl cyclase 9. *Neuroendocrinology* 85, 257–266.
- Martin, S.L., Saint-Criq, V., Hwang, T.-C., and Csanády, L. (2018). Ion channels as targets to treat cystic fibrosis lung disease. *J. Cyst. Fibros.* 17, S22–S27.
- Masson, A., Schneider-Futschik, E.K., Baatallah, N., Nguyen-Khoa, T., Girodon, E., Hatton, A., Flament, T., Le Bourgeois, M., Chedevergne, F., Bailly, C., et al. (2019). Predictive factors for lumacaftor/ivacaftor clinical response. *J. Cyst. Fibros.* 18, 368–374.

- Matsu-Ura, T., Shirakawa, H., Suzuki, K.G.N., Miyamoto, A., Sugiura, K., Michikawa, T., Kusumi, A., and Mikoshiba, K. (2019). Dual-FRET imaging of IP₃ and Ca²⁺ revealed Ca²⁺-induced IP₃ production maintains long lasting Ca²⁺ oscillations in fertilized mouse eggs. *Sci Rep* 9, 4829.
- May, M.J., and Ghosh, S. (1998). Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol. Today* 19, 80–88.
- Meisenhelder, J., Suh, P.G., Rhee, S.G., and Hunter, T. (1989). Phospholipase C-gamma is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro. *Cell* 57, 1109–1122.
- Mellor, H., and Parker, P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332 (Pt 2), 281–292.
- Mercado, J., Gordon-Shaag, A., Zagotta, W.N., and Gordon, S.E. (2010). Ca²⁺-dependent desensitization of TRPV2 channels is mediated by hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci.* 30, 13338–13347.
- van der Merwe, J.Q., Moreau, F., and MacNaughton, W.K. (2009). Protease-activated receptor-2 stimulates intestinal epithelial chloride transport through activation of PLC and selective PKC isoforms. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G1258-1266.
- Michell, R.H. (1975). Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* 415, 81–47.
- Misra, U.K., and Pizzo, S.V. (2012). Upregulation of mTORC2 activation by the selective agonist of EPAC, 8-CPT-2Me-cAMP, in prostate cancer cells: assembly of a multiprotein signaling complex. *J. Cell. Biochem.* 113, 1488–1500.
- Mongiorgi, S., Follo, M.Y., Clissa, C., Giardino, R., Fini, M., Manzoli, L., Ramazzotti, G., Fiume, R., Finelli, C., and Cocco, L. (2012). Nuclear PI-PLC β 1 and Myelodysplastic syndromes: from bench to clinics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 362, 235–245.
- Muimo, R. (2009). Regulation of CFTR function by annexin A2-S100A10 complex in health and disease. *Gen. Physiol. Biophys.* 28 *Spec No Focus*, F14-19.
- Mukai, H., and Ono, Y. (1994). A novel protein kinase with leucine zipper-like sequences: its catalytic domain is highly homologous to that of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 897–904.
- Mulcahy, L.R., Isabella, V.M., and Lewis, K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb. Ecol.* 68, 1–12.
- Naciff, J.M., Behbehani, M.M., Kaetzel, M.A., and Dedman, J.R. (1996). Annexin VI modulates Ca²⁺ and K⁺ conductances of spinal cord and dorsal root ganglion neurons. *Am. J. Physiol.* 271, C2004-2015.
- Nagano, T., Edamatsu, H., Kobayashi, K., Takenaka, N., Yamamoto, M., Sasaki, N., Nishimura, Y., and Kataoka, T. (2014). Phospholipase ϵ , an effector of ras and rap small GTPases, is required for airway inflammatory response in a mouse model of bronchial asthma. *PLoS ONE* 9, e108373.
- Nakahara, M., Shimosawa, M., Nakamura, Y., Irino, Y., Morita, M., Kudo, Y., and Fukami, K. (2005). A novel phospholipase C, PLC(ϵ)2, is a neuron-specific isozyme. *J. Biol. Chem.* 280, 29128–29134.
- Nakamura, Y., and Fukami, K. (2017). Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C. *J. Biochem.*

- Nakamura, Y., Fukami, K., Yu, H., Takenaka, K., Kataoka, Y., Shirakata, Y., Nishikawa, S.-I., Hashimoto, K., Yoshida, N., and Takenawa, T. (2003). Phospholipase Cdelta1 is required for skin stem cell lineage commitment. *EMBO J.* 22, 2981–2991.
- Nakamura, Y., Hamada, Y., Fujiwara, T., Enomoto, H., Hiroe, T., Tanaka, S., Nose, M., Nakahara, M., Yoshida, N., Takenawa, T., et al. (2005). Phospholipase C-delta1 and -delta3 are essential in the trophoblast for placental development. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10979–10988.
- Nakamura, Y., Ichinohe, M., Hirata, M., Matsuura, H., Fujiwara, T., Igarashi, T., Nakahara, M., Yamaguchi, H., Yasugi, S., Takenawa, T., et al. (2008). Phospholipase C-delta1 is an essential molecule downstream of Foxn1, the gene responsible for the nude mutation, in normal hair development. *FASEB J.* 22, 841–849.
- Nakamura, Y., Kanemaru, K., Kojima, R., Hashimoto, Y., Marunouchi, T., Oka, N., Ogura, T., Tanonaka, K., and Fukami, K. (2014). Simultaneous loss of phospholipase Cδ1 and phospholipase Cδ3 causes cardiomyocyte apoptosis and cardiomyopathy. *Cell Death Dis* 5, e1215.
- Nambudiri, V.E., and Widlund, H.R. (2013). Small interfering RNA. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1–4.
- Namkung, W., Finkbeiner, W.E., and Verkman, A.S. (2010). CFTR-adenylyl cyclase I association responsible for UTP activation of CFTR in well-differentiated primary human bronchial cell cultures. *Mol. Biol. Cell* 21, 2639–2648.
- Nash, M.S., Young, K.W., Willars, G.B., Challiss, R.A., and Nahorski, S.R. (2001). Single-cell imaging of graded Ins(1,4,5)P3 production following G-protein-coupled-receptor activation. *Biochem. J.* 356, 137–142.
- Neuman, R.I., van Kalmthout, J.A.M., Pfau, D.J., Menendez, D.M., Young, L.H., and Forrest, J.N. (2018). AMP-activated protein kinase and adenosine are both metabolic modulators that regulate chloride secretion in the shark rectal gland (*Squalus acanthias*). *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 314, C473–C482.
- Nguyen, N.T., Han, W., Cao, W.-M., Wang, Y., Wen, S., Huang, Y., Li, M., Du, L., and Zhou, Y. (2018). Store-Operated Calcium Entry Mediated by ORAI and STIM. *Compr Physiol* 8, 981–1002.
- Nomikos, M., Kashir, J., and Lai, F.A. (2017a). The role and mechanism of action of sperm PLC-zeta in mammalian fertilisation. *Biochem. J.* 474, 3659–3673.
- Nomikos, M., Stamatiadis, P., Sanders, J.R., Beck, K., Calver, B.L., Buntwal, L., Lofty, M., Sideratou, Z., Swann, K., and Lai, F.A. (2017b). Male infertility-linked point mutation reveals a vital binding role for the C2 domain of sperm PLCζ. *Biochem. J.* 474, 1003–1016.
- Novara, M., Baldelli, P., Cavallari, D., Carabelli, V., Giaccipoli, A., and Carbone, E. (2004). Exposure to cAMP and beta-adrenergic stimulation recruits Ca(V)3 T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins. *J. Physiol. (Lond.)* 558, 433–449.
- Oestreich, E.A., Malik, S., Goonasekera, S.A., Blaxall, B.C., Kelley, G.G., Dirksen, R.T., and Smrcka, A.V. (2009). Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca²⁺ release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II. *J. Biol. Chem.* 284, 1514–1522.
- Oh, Y.-S., Jo, N.W., Choi, J.W., Kim, H.S., Seo, S.-W., Kang, K.-O., Hwang, J.-I., Heo, K., Kim, S.-H., Kim, Y.-H., et al. (2004). NHERF2 specifically interacts with LPA2 receptor and defines the specificity and efficiency of receptor-mediated phospholipase C-beta3 activation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5069–5079.

- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., and Nishizuka, Y. (1987). Identification of three additional members of rat protein kinase C family: delta-, epsilon- and zeta-subspecies. *FEBS Lett.* 226, 125–128.
- Osada, S., Mizuno, K., Saido, T.C., Akita, Y., Suzuki, K., Kuroki, T., and Ohno, S. (1990). A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC eta, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J. Biol. Chem.* 265, 22434–22440.
- Osada, S., Mizuno, K., Saido, T.C., Suzuki, K., Kuroki, T., and Ohno, S. (1992). A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3930–3938.
- Ousingsawat, J., Kongsuphol, P., Schreiber, R., and Kunzelmann, K. (2011). CFTR and TMEM16A are separate but functionally related Cl⁻ channels. *Cell. Physiol. Biochem.* 28, 715–724.
- Palmer, R.H., Ridden, J., and Parker, P.J. (1995). Cloning and expression patterns of two members of a novel protein-kinase-C-related kinase family. *Eur. J. Biochem.* 227, 344–351.
- Patel, W., Moore, P.J., Sassano, M.F., Lopes-Pacheco, M., Aleksandrov, A.A., Amaral, M.D., Tarran, R., and Gray, M.A. (2018). Increases in cytosolic Ca²⁺ induce dynamin- and calcineurin-dependent internalisation of CFTR. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Paterson, H.F., Savopoulos, J.W., Perisic, O., Cheung, R., Ellis, M.V., Williams, R.L., and Katan, M. (1995). Phospholipase C delta 1 requires a pleckstrin homology domain for interaction with the plasma membrane. *Biochem. J.* 312 (Pt 3), 661–666.
- Pears, C.J., Kour, G., House, C., Kemp, B.E., and Parker, P.J. (1990). Mutagenesis of the pseudosubstrate site of protein kinase C leads to activation. *Eur. J. Biochem.* 194, 89–94.
- Philippe, R., Antigny, F., Buscaglia, P., Norez, C., Becq, F., Frieden, M., and Mignen, O. (2015). SERCA and PMCA pumps contribute to the deregulation of Ca²⁺ homeostasis in human CF epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 892–903.
- Picciotto, M.R., Cohn, J.A., Bertuzzi, G., Greengard, P., and Nairn, A.C. (1992). Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 267, 12742–12752.
- Piechulek, T., Rehlen, T., Walliser, C., Vatter, P., Moepps, B., and Gierschik, P. (2005). Isozyme-specific stimulation of phospholipase C-gamma2 by Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* 280, 38923–38931.
- Popovics, P., and Stewart, A.J. (2012). Putative roles for phospholipase Cη enzymes in neuronal Ca²⁺ signal modulation. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 282–286.
- Popovics, P., Beswick, W., Guild, S.B., Cramb, G., Morgan, K., Millar, R.P., and Stewart, A.J. (2011). Phospholipase C-η2 is activated by elevated intracellular Ca(2+) levels. *Cell. Signal.* 23, 1777–1784.
- Prandini, P., De Logu, F., Fusi, C., Provezza, L., Nassini, R., Montagner, G., Materazzi, S., Munari, S., Gilioli, E., Bezzerri, V., et al. (2016). Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channels Modulate Inflammatory Response in Respiratory Cells from Patients with Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 55, 645–656.
- Rafeeq, M.M., and Murad, H.A.S. (2017). Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *J Transl Med* 15, 84.

- Rafehi, M., and Müller, C.E. (2018). Tools and drugs for uracil nucleotide-activated P2Y receptors. *Pharmacol. Ther.* 190, 24–80.
- Raghuram, V., Mak, D.O., and Foscett, J.K. (2001). Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1300–1305.
- Ramachandran, S., Krishnamurthy, S., Jacobi, A.M., Wohlford-Lenane, C., Behlke, M.A., Davidson, B.L., and McCray, P.B. (2013). Efficient delivery of RNA interference oligonucleotides to polarized airway epithelia in vitro. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 305, L23–32.
- Ramadurai, S.M., Chen, W.-Y., Yerozolimsky, G.B., Zagami, M., Dammann, C.E.L., and Nielsen, H.C. (2003). Cell-specific and developmental expression of phospholipase C-gamma and diacylglycerol in fetal lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 284, L808–816.
- Rasmussen, J.E., Sheridan, J.T., Polk, W., Davies, C.M., and Tarran, R. (2014). Cigarette smoke-induced Ca²⁺ release leads to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) dysfunction. *J. Biol. Chem.* 289, 7671–7681.
- Raynal, B.D.E., Hardingham, T.E., Sheehan, J.K., and Thornton, D.J. (2003). Calcium-dependent protein interactions in MUC5B provide reversible cross-links in salivary mucus. *J. Biol. Chem.* 278, 28703–28710.
- Reczek, D., and Bretscher, A. (2001). Identification of EPI64, a TBC/rabGAP domain-containing microvillar protein that binds to the first PDZ domain of EBP50 and E3KARP. *J. Cell Biol.* 153, 191–206.
- Rentero, C., Blanco-Muñoz, P., Meneses-Salas, E., Grewal, T., and Enrich, C. (2018). Annexins- Coordinators of Cholesterol Homeostasis in Endocytic Pathways. *Int J Mol Sci* 19.
- Réty, S., Sopkova, J., Renouard, M., Osterloh, D., Gerke, V., Tabaries, S., Russo-Marie, F., and Lewit-Bentley, A. (1999). The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat. Struct. Biol.* 6, 89–95.
- Rhee, S.G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 281–312.
- Rhee, S.G. (2013). Reflections on the days of phospholipase C. *Adv Biol Regul* 53, 223–231.
- Ribeiro, C.M.P. (2006). The role of intracellular calcium signals in inflammatory responses of polarised cystic fibrosis human airway epithelia. *Drugs R D* 7, 17–31.
- Ridley, C., Kouvatsos, N., Raynal, B.D., Howard, M., Collins, R.F., Desseyn, J.-L., Jowitt, T.A., Baldock, C., Davis, C.W., Hardingham, T.E., et al. (2014). Assembly of the respiratory mucin MUC5B: a new model for a gel-forming mucin. *J. Biol. Chem.* 289, 16409–16420.
- Rimessi, A., Bezzerri, V., Salvatori, F., Tamanini, A., Nigro, F., Dececchi, M.C., Santangelo, A., Prandini, P., Munari, S., Provezza, L., et al. (2018). PLCB3 Loss-of-function Reduces P. aeruginosa-dependent IL-8 Release in Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., and Chou, J.L. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066–1073.

- Robledo-Avila, F.H., Ruiz-Rosado, J. de D., Brockman, K.L., Kopp, B.T., Amer, A.O., McCoy, K., Bakaletz, L.O., and Partida-Sanchez, S. (2018). Dysregulated Calcium Homeostasis in Cystic Fibrosis Neutrophils Leads to Deficient Antimicrobial Responses. *J. Immunol.* *201*, 2016–2027.
- Rogers, N.T., Hobson, E., Pickering, S., Lai, F.A., Braude, P., and Swann, K. (2004). Phospholipase C ζ causes Ca²⁺ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction* *128*, 697–702.
- Rohacs, T. (2015). Phosphoinositide regulation of TRPV1 revisited. *Pflugers Arch.* *467*, 1851–1869.
- Rohács, T., Lopes, C.M.B., Michailidis, I., and Logothetis, D.E. (2005). PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* *8*, 626–634.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A., and Bos, J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* *396*, 474–477.
- de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A., and Bos, J.L. (2000). Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J. Biol. Chem.* *275*, 20829–20836.
- Rosse, C., Linch, M., Kermorgant, S., Cameron, A.J.M., Boeckeler, K., and Parker, P.J. (2010). PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 103–112.
- Rowbotham, N.J., Palser, S.C., Smith, S.J., and Smyth, A.R. (2019). Infection prevention and control in cystic fibrosis: a systematic review of interventions. *Expert Rev Respir Med* *13*, 425–434.
- Rowe, S.M., Daines, C., Ringshausen, F.C., Kerem, E., Wilson, J., Tullis, E., Nair, N., Simard, C., Han, L., Ingenito, E.P., et al. (2017). Tezacaftor-Ivacaftor in Residual-Function Heterozygotes with Cystic Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* *377*, 2024–2035.
- Rubenstein, R.C., Lockwood, S.R., Lide, E., Bauer, R., Suaud, L., and Grumbach, Y. (2011). Regulation of endogenous ENaC functional expression by CFTR and $\Delta F508$ -CFTR in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *300*, L88–L101.
- Ruffin, M., Volland, M., Marie, S., Bonora, M., Blanchard, E., Blouquit-Laye, S., Naline, E., Puyo, P., Le Rouzic, P., Guillot, L., et al. (2013). Anoctamin 1 dysregulation alters bronchial epithelial repair in cystic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta* *1832*, 2340–2351.
- Ruknudin, A., Schulze, D.H., Sullivan, S.K., Lederer, W.J., and Welling, P.A. (1998). Novel subunit composition of a renal epithelial KATP channel. *J. Biol. Chem.* *273*, 14165–14171.
- Ryu, S.H., Cho, K.S., Lee, K.Y., Suh, P.G., and Rhee, S.G. (1986). Two forms of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from bovine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *141*, 137–144.
- Ryu, S.H., Suh, P.G., Cho, K.S., Lee, K.Y., and Rhee, S.G. (1987). Bovine brain cytosol contains three immunologically distinct forms of inositolphospholipid-specific phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *84*, 6649–6653.
- Sachyani, D., Dvir, M., Strulovich, R., Tria, G., Tobelaim, W., Peretz, A., Pongs, O., Svergun, D., Attali, B., and Hirsch, J.A. (2014). Structural Basis of a Kv7.1 Potassium Channel Gating Module: Studies of the Intracellular C-Terminal Domain in Complex with Calmodulin. *Structure* *22*, 1582–1594.

- Saint-Criq, V., and Gray, M.A. (2017). Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 93–115.
- Salomon, J.J., Spahn, S., Wang, X., Füllekrug, J., Bertrand, C.A., and Mall, M.A. (2016). Generation and functional characterization of epithelial cells with stable expression of SLC26A9 Cl⁻ channels. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **310**, L593-602.
- Sasse, S.K., Kadiyala, V., Danhorn, T., Panettieri, R.A., Phang, T.L., and Gerber, A.N. (2017). Glucocorticoid Receptor ChIP-Seq Identifies PLCD1 as a KLF15 Target that Represses Airway Smooth Muscle Hypertrophy. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **57**, 226–237.
- Satoh, T., Edamatsu, H., and Kataoka, T. (2006). Phospholipase Cepsilon guanine nucleotide exchange factor activity and activation of Rap1. *Meth. Enzymol.* **407**, 281–290.
- Saunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J., Blayney, L.M., Swann, K., and Lai, F.A. (2002). PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development* **129**, 3533–3544.
- Schmidt, M., Evellin, S., Weernink, P.A., von Dorp, F., Rehmann, H., Lomasney, J.W., and Jakobs, K.H. (2001). A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1020–1024.
- Schmidt, M., Dekker, F.J., and Maarsingh, H. (2013). Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. *Pharmacol. Rev.* **65**, 670–709.
- Seavilleklein, G., Amer, N., Evagelidis, A., Chappe, F., Irvine, T., Hanrahan, J.W., and Chappe, V. (2008). PKC phosphorylation modulates PKA-dependent binding of the R domain to other domains of CFTR. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **295**, C1366-1375.
- Seemann, J., Weber, K., and Gerke, V. (1997). Annexin I targets S100C to early endosomes. *FEBS Lett.* **413**, 185–190.
- Selbie, L.A., Schmitz-Peiffer, C., Sheng, Y., and Biden, T.J. (1993). Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 24296–24302.
- Sharma, N., LaRusch, J., Sosnay, P.R., Gottschalk, L.B., Lopez, A.P., Pellicore, M.J., Evans, T., Davis, E., Atalar, M., Na, C.-H., et al. (2016). A sequence upstream of canonical PDZ-binding motif within CFTR COOH-terminus enhances NHERF1 interaction. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **311**, L1170–L1182.
- Shi, G.-X., Rehmann, H., and Andres, D.A. (2006). A novel cyclic AMP-dependent Epac-Rit signaling pathway contributes to PACAP38-mediated neuronal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 9136–9147.
- Shibata, H., Mukai, H., Inagaki, Y., Homma, Y., Kimura, K., Kaibuchi, K., Narumiya, S., and Ono, Y. (1996). Characterization of the interaction between RhoA and the amino-terminal region of PKN. *FEBS Lett.* **385**, 221–224.
- Smrcka, A.V., and Sternweis, P.C. (1993). Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C beta by G protein alpha and beta gamma subunits. *J. Biol. Chem.* **268**, 9667–9674.

- Somekawa, S., Fukuhara, S., Nakaoka, Y., Fujita, H., Saito, Y., and Mochizuki, N. (2005). Enhanced functional gap junction neoformation by protein kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. *Circ. Res.* **97**, 655–662.
- Song, C., Hu, C.D., Masago, M., Kariyai, K., Yamawaki-Kataoka, Y., Shibatohe, M., Wu, D., Satoh, T., and Kataoka, T. (2001). Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras. *J. Biol. Chem.* **276**, 2752–2757.
- Song, C., Satoh, T., Edamatsu, H., Wu, D., Tadano, M., Gao, X., and Kataoka, T. (2002). Differential roles of Ras and Rap1 in growth factor-dependent activation of phospholipase C epsilon. *Oncogene* **21**, 8105–8113.
- Sosnay, P.R., Siklosi, K.R., Van Goor, F., Kaniecki, K., Yu, H., Sharma, N., Ramalho, A.S., Amaral, M.D., Dorfman, R., Zielenski, J., et al. (2013). Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat. Genet.* **45**, 1160–1167.
- Southern, E. (2015). The early days of blotting. *Methods Mol. Biol.* **1312**, 1–3.
- Stathopulos, P.B., Schindl, R., Fahrner, M., Zheng, L., Gasmi-Seabrook, G.M., Muik, M., Romanin, C., and Ikura, M. (2013). STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-operated calcium entry. *Nat Commun* **4**, 2963.
- Ster, J., De Bock, F., Guérineau, N.C., Janossy, A., Barrère-Lemaire, S., Bos, J.L., Bockaert, J., and Fagni, L. (2007). Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP activation of p38 MAPK and modulation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in cerebellar neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 2519–2524.
- Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J., and Schulz, I. (1983). Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306**, 67–69.
- Strickland, K.M., Stock, G., Cui, G., Hwang, H., Infield, D.T., Schmidt-Krey, I., McCarty, N.A., and Gumbart, J.C. (2019). ATP-Dependent Signaling in Simulations of a Revised Model of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). *J Phys Chem B* **123**, 3177–3188.
- Stutts, M.J., Canessa, C.M., Olsen, J.C., Hamrick, M., Cohn, J.A., Rossier, B.C., and Boucher, R.C. (1995). CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* **269**, 847–850.
- Suetsugu, S., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2014). Dynamic shaping of cellular membranes by phospholipids and membrane-deforming proteins. *Physiol. Rev.* **94**, 1219–1248.
- Suh, P.-G., Park, J.-I., Manzoli, L., Cocco, L., Peak, J.C., Katan, M., Fukami, K., Kataoka, T., Yun, S., and Ryu, S.H. (2008). Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep* **41**, 415–434.
- Suzuki, A., Yamanaka, T., Hirose, T., Manabe, N., Mizuno, K., Shimizu, M., Akimoto, K., Izumi, Y., Ohnishi, T., and Ohno, S. (2001). Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J. Cell Biol.* **152**, 1183–1196.
- Swairjo, M.A., Concha, N.O., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R., and Seaton, B.A. (1995). Ca²⁺-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 968–974.

- Szkotak, A.J., Man, S.F.P., and Duszyk, M. (2003). The role of the basolateral outwardly rectifying chloride channel in human airway epithelial anion secretion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29, 710–720.
- Tabary, O., Boncoeur, E., de Martin, R., Pepperkok, R., Clément, A., Schultz, C., and Jacquot, J. (2006). Calcium-dependent regulation of NF-(kappa)B activation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell. Signal.* 18, 652–660.
- Tabcharani, J.A., Chang, X.B., Riordan, J.R., and Hanrahan, J.W. (1991). Phosphorylation-regulated Cl-channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* 352, 628–631.
- Tadano, M., Edamatsu, H., Minamisawa, S., Yokoyama, U., Ishikawa, Y., Suzuki, N., Saito, H., Wu, D., Masago-Toda, M., Yamawaki-Kataoka, Y., et al. (2005). Congenital semilunar valvulogenesis defect in mice deficient in phospholipase C epsilon. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2191–2199.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M., and Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J. Biol. Chem.* 252, 7603–7609.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T., and Nishizuka, Y. (1979). Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 91, 1218–1224.
- Takenaka, N., Edamatsu, H., Suzuki, N., Saito, H., Inoue, Y., Oka, M., Hu, L., and Kataoka, T. (2011). Overexpression of phospholipase Cε in keratinocytes upregulates cytokine expression and causes dermatitis with acanthosis and T-cell infiltration. *Eur. J. Immunol.* 41, 202–213.
- Takenawa, T., and Nagai, Y. (1981). Purification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from rat liver. *J. Biol. Chem.* 256, 6769–6775.
- Takumida, M., Ishibashi, T., Hamamoto, T., Hirakawa, K., and Anniko, M. (2009). Age-dependent changes in the expression of klotho protein, TRPV5 and TRPV6 in mouse inner ear. *Acta Otolaryngol.* 129, 1340–1350.
- Tang, W.J., Krupinski, J., and Gilman, A.G. (1991). Expression and characterization of calmodulin-activated (type I) adenylcyclase. *J. Biol. Chem.* 266, 8595–8603.
- Tang, X.X., Ostedgaard, L.S., Hoegger, M.J., Moninger, T.O., Karp, P.H., McMenimen, J.D., Choudhury, B., Varki, A., Stoltz, D.A., and Welsh, M.J. (2016). Acidic pH increases airway surface liquid viscosity in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 126, 879–891.
- Taylor-Cousar, J.L., Munck, A., McKone, E.F., van der Ent, C.K., Moeller, A., Simard, C., Wang, L.T., Ingenito, E.P., McKee, C., Lu, Y., et al. (2017). Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N. Engl. J. Med.* 377, 2013–2023.
- Thakur, D.P., Tian, J., Jeon, J., Xiong, J., Huang, Y., Flockerzi, V., and Zhu, M.X. (2016). Critical roles of Gi/o proteins and phospholipase C-δ1 in the activation of receptor-operated TRPC4 channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 1092–1097.
- Thelin, W.R., Kesimer, M., Tarran, R., Kreda, S.M., Grubb, B.R., Sheehan, J.K., Stutts, M.J., and Milgram, S.L. (2005). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is regulated by a direct interaction with the protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 280, 41512–41520.

- Thiagarajah, J.R., Song, Y., Haggie, P.M., and Verkman, A.S. (2004). A small molecule CFTR inhibitor produces cystic fibrosis-like submucosal gland fluid secretions in normal airways. *FASEB J.* 18, 875–877.
- Thiel, C., Osborn, M., and Gerke, V. (1992). The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembranous cytoskeleton depends on intact p11- and Ca(2+)-binding sites. *J. Cell. Sci.* 103 (Pt 3), 733–742.
- Thompson, J.L., and Shuttleworth, T.J. (2011). Orai channel-dependent activation of phospholipase C- δ : a novel mechanism for the effects of calcium entry on calcium oscillations. *J. Physiol. (Lond.)* 589, 5057–5069.
- Thyagarajan, B., Lukacs, V., and Rohacs, T. (2008). Hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates calcium-induced inactivation of TRPV6 channels. *J. Biol. Chem.* 283, 14980–14987.
- Thyagarajan, B., Benn, B.S., Christakos, S., and Rohacs, T. (2009). Phospholipase C-mediated regulation of transient receptor potential vanilloid 6 channels: implications in active intestinal Ca²⁺ transport. *Mol. Pharmacol.* 75, 608–616.
- Tong, J., Liu, X., Vickstrom, C., Li, Y., Yu, L., Lu, Y., Smrcka, A.V., and Liu, Q.-S. (2017). The Epac-Phospholipase C ϵ Pathway Regulates Endocannabinoid Signaling and Cocaine-Induced Disinhibition of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons. *J. Neurosci.* 37, 3030–3044.
- Towbin, H. (2015). Origins of protein blotting. *Methods Mol. Biol.* 1312, 5–7.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350–4354.
- Travis, S.M., Berger, H.A., and Welsh, M.J. (1997). Protein phosphatase 2C dephosphorylates and inactivates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 11055–11060.
- Trouvé, P., Le Drévo, M.-A., Kerbiriou, M., Friocourt, G., Fichou, Y., Gillet, D., and Férec, C. (2007). Annexin V is directly involved in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator's chloride channel function. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 1121–1133.
- Umar, S., Scott, J., Sellin, J.H., Dubinsky, W.P., and Morris, A.P. (2000a). Murine colonic mucosa hyperproliferation. I. Elevated CFTR expression and enhanced cAMP-dependent Cl⁽⁻⁾ secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, G753–764.
- Umar, S., Sellin, J.H., and Morris, A.P. (2000b). Murine colonic mucosa hyperproliferation. II. PKC-beta activation and cPKC-mediated cellular CFTR overexpression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, G765–774.
- Ussing, H.H., and Zerahn, K. (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 23, 110–127.
- Vachel, L., Norez, C., Jayle, C., Becq, F., and Vandebrouck, C. (2015). The low PLC- δ 1 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells induces upregulation of TRPV6 channel activity. *Cell Calcium* 57, 38–48.

- Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuys, P.D.J., Burton, B., Cao, D., Neuberger, T., Turnbull, A., Singh, A., Joubran, J., Hazlewood, A., et al. (2009). Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 18825–18830.
- Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuys, P.D.J., Burton, B., Stack, J.H., Straley, K.S., Decker, C.J., Miller, M., McCartney, J., Olson, E.R., et al. (2011). Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 18843–18848.
- Velisetty, P., Borbiri, I., Kasimova, M.A., Liu, L., Badheka, D., Carnevale, V., and Rohacs, T. (2016). A molecular determinant of phosphoinositide affinity in mammalian TRPV channels. *Sci Rep* *6*, 27652.
- Villalobo, A., Ishida, H., Vogel, H.J., and Berchtold, M.W. (2018). Calmodulin as a protein linker and a regulator of adaptor/scaffold proteins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* *1865*, 507–521.
- Vorherr, T., Knöpfel, L., Hofmann, F., Mollner, S., Pfeuffer, T., and Carafoli, E. (1993). The calmodulin binding domain of nitric oxide synthase and adenylyl cyclase. *Biochemistry* *32*, 6081–6088.
- Waldo, G.L., Ricks, T.K., Hicks, S.N., Cheever, M.L., Kawano, T., Tsuboi, K., Wang, X., Montell, C., Kozasa, T., Sondek, J., et al. (2010). Kinetic scaffolding mediated by a phospholipase C-beta and Gq signaling complex. *Science* *330*, 974–980.
- Walliser, C., Retlich, M., Harris, R., Everett, K.L., Josephs, M.B., Vatter, P., Esposito, D., Driscoll, P.C., Katan, M., Gierschik, P., et al. (2008). rac regulates its effector phospholipase Cgamma2 through interaction with a split pleckstrin homology domain. *J. Biol. Chem.* *283*, 30351–30362.
- Wang, C.K., Pan, L., Chen, J., and Zhang, M. (2010). Extensions of PDZ domains as important structural and functional elements. *Protein Cell* *1*, 737–751.
- Wang, D., Sun, Y., Zhang, W., and Huang, P. (2008a). Apical adenosine regulates basolateral Ca²⁺-activated potassium channels in human airway Calu-3 epithelial cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *294*, C1443-1453.
- Wang, L.P., Lim, C., Kuan, Y., Chen, C.L., Chen, H.F., and King, K. (1996). Positive charge at position 549 is essential for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-hydrolyzing but not phosphatidylinositol-hydrolyzing activities of human phospholipase C delta1. *J. Biol. Chem.* *271*, 24505–24516.
- Wang, S., Raab, R.W., Schatz, P.J., Guggino, W.B., and Li, M. (1998). Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett.* *427*, 103–108.
- Wang, T., Dowal, L., El-Maghrabi, M.R., Rebecchi, M., and Scarlata, S. (2000). The pleckstrin homology domain of phospholipase C-beta(2) links the binding of gbetagamma to activation of the catalytic core. *J. Biol. Chem.* *275*, 7466–7469.
- Wang, Z., Liu, B., Wang, P., Dong, X., Fernandez-Hernando, C., Li, Z., Hla, T., Li, Z., Claffey, K., Smith, J.D., et al. (2008b). Phospholipase C beta3 deficiency leads to macrophage hypersensitivity to apoptotic induction and reduction of atherosclerosis in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 195–204.
- Watcharasit, P., Tucholski, J., and Jope, R.S. (2001). Src family kinase involvement in muscarinic receptor-induced tyrosine phosphorylation in differentiated SH-SY5Y cells. *Neurochem. Res.* *26*, 809–816.

- Wayman, G.A., Wei, J., Wong, S., and Storm, D.R. (1996). Regulation of type I adenylyl cyclase by calmodulin kinase IV in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6075–6082.
- Wei, J., Wayman, G., and Storm, D.R. (1996). Phosphorylation and inhibition of type III adenylyl cyclase by calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *J. Biol. Chem.* 271, 24231–24235.
- Wei, J., Zhao, A.Z., Chan, G.C., Baker, L.P., Impey, S., Beavo, J.A., and Storm, D.R. (1998). Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in Neurons: a mechanism for attenuation of olfactory signals. *Neuron* 21, 495–504.
- Wei, L., Vankeerberghen, A., Cuppens, H., Eggermont, J., Cassiman, J.J., Droogmans, G., and Nilius, B. (1999). Interaction between calcium-activated chloride channels and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers Arch.* 438, 635–641.
- Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiological Reviews* 85, 1159–1204.
- Wu, C., Ma, M.H., Brown, K.R., Geisler, M., Li, L., Tzeng, E., Jia, C.Y.H., Jurisica, I., and Li, S.S.-C. (2007). Systematic identification of SH3 domain-mediated human protein-protein interactions by peptide array target screening. *Proteomics* 7, 1775–1785.
- Wu, S.S., Jácamo, R.O., Vong, S.K., and Rozengurt, E. (2006). Differential regulation of Pyk2 phosphorylation at Tyr-402 and Tyr-580 in intestinal epithelial cells: roles of calcium, Src, Rho kinase, and the cytoskeleton. *Cell. Signal.* 18, 1932–1940.
- Wu, Z., Wong, S.T., and Storms, D.R. (1993). Modification of the calcium and calmodulin sensitivity of the type I adenylyl cyclase by mutagenesis of its calmodulin binding domain. *J. Biol. Chem.* 268, 23766–23768.
- Xia, D., Qu, L., Li, G., Hongdu, B., Xu, C., Lin, X., Lou, Y., He, Q., Ma, D., and Chen, Y. (2016). MARCH2 regulates autophagy by promoting CFTR ubiquitination and degradation and PIK3CA-AKT-MTOR signaling. *Autophagy* 12, 1614–1630.
- Xiao, W., Hong, H., Kawakami, Y., Kato, Y., Wu, D., Yasudo, H., Kimura, A., Kubagawa, H., Bertoli, L.F., Davis, R.S., et al. (2009). Tumor suppression by phospholipase C-beta3 via SHP-1-mediated dephosphorylation of Stat5. *Cancer Cell* 16, 161–171.
- Xiao, W., Kashiwakura, J.-I., Hong, H., Yasudo, H., Ando, T., Maeda-Yamamoto, M., Wu, D., Kawakami, Y., and Kawakami, T. (2011). Phospholipase C-β3 regulates FcεRI-mediated mast cell activation by recruiting the protein phosphatase SHP-1. *Immunity* 34, 893–904.
- Xu, R., Li, Q., Zhou, X.-D., Perelman, J.M., and Kolosov, V.P. (2013). Oxidative stress mediates the disruption of airway epithelial tight junctions through a TRPM2-PLCγ1-PKCα signaling pathway. *Int J Mol Sci* 14, 9475–9486.
- Yablonski, D., Kadlecsek, T., and Weiss, A. (2001). Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4208–4218.
- Yamamoto, S., Ichishima, K., and Ehara, T. (2007). Regulation of extracellular UTP-activated Cl⁻ current by P2Y-PLC-PKC signaling and ATP hydrolysis in mouse ventricular myocytes. *J Physiol Sci* 57, 85–94.

- Yamamoto, T., Takeuchi, H., Kanematsu, T., Allen, V., Yagisawa, H., Kikkawa, U., Watanabe, Y., Nakasima, A., Katan, M., and Hirata, M. (1999). Involvement of EF hand motifs in the Ca^{2+} -dependent binding of the pleckstrin homology domain to phosphoinositides. *Eur. J. Biochem.* 265, 481–490.
- Yonemura, S., Matsui, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2002). Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *J. Cell. Sci.* 115, 2569–2580.
- Yu, P., Constien, R., Dear, N., Katan, M., Hanke, P., Bunney, T.D., Kunder, S., Quintanilla-Martinez, L., Huffstadt, U., Schröder, A., et al. (2005). Autoimmunity and inflammation due to a gain-of-function mutation in phospholipase C gamma 2 that specifically increases external Ca^{2+} entry. *Immunity* 22, 451–465.
- Yudin, Y., Lukacs, V., Cao, C., and Rohacs, T. (2011). Decrease in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels mediates desensitization of the cold sensor TRPM8 channels. *J. Physiol. (Lond.)* 589, 6007–6027.
- Yue, G., Malik, B., Yue, G., and Eaton, D.C. (2002). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) stimulates epithelial sodium channel activity in A6 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 11965–11969.
- Zakharian, E., Cao, C., and Rohacs, T. (2011). Intracellular ATP supports TRPV6 activity via lipid kinases and the generation of PtdIns(4,5) P₂. *FASEB J.* 25, 3915–3928.
- Zha, W.-J., Qian, Y., Shen, Y., Du, Q., Chen, F.-F., Wu, Z.-Z., Li, X., and Huang, M. (2013). Galangin Abrogates Ovalbumin-Induced Airway Inflammation via Negative Regulation of NF- κ B. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 767689.
- Zhang, L., Malik, S., Kelley, G.G., Kapiloff, M.S., and Smrcka, A.V. (2011). Phospholipase C epsilon scaffolds to muscle-specific A kinase anchoring protein (mAKAPbeta) and integrates multiple hypertrophic stimuli in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 23012–23021.
- Zhang, L., Malik, S., Pang, J., Wang, H., Park, K.M., Yule, D.I., Blaxall, B.C., and Smrcka, A.V. (2013). Phospholipase C ϵ hydrolyzes perinuclear phosphatidylinositol 4-phosphate to regulate cardiac hypertrophy. *Cell* 153, 216–227.
- Zhang, W., Zhang, Z., Zhang, Y., and Naren, A.P. (2017). CFTR-NHERF2-LPA₂ Complex in the Airway and Gut Epithelia. *Int J Mol Sci* 18.
- Zhou, Y., Sondek, J., and Harden, T.K. (2008). Activation of human phospholipase C- ϵ 2 by Gbetagamma. *Biochemistry* 47, 4410–4417.
- Zhu, J.X., Zhang, G.H., Yang, N., Rowlands, D.K., Wong, H.Y.C., Tsang, L.L., Chung, Y.W., and Chan, H.C. (2005). Activation of apical CFTR and basolateral Ca^{2+} -activated K⁺ channels by tetramethylpyrazine in Caco-2 cell line. *Eur. J. Pharmacol.* 510, 187–195.

Annexes

Article scientifique :

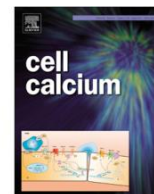
Focus on TRP channels in cystic fibrosis

Chloé Grébert, Frédéric Becq, Clarisse Vandebrouck

Laboratoire signalisation et transports ioniques membranaires, Université de Poitiers

Acctépté le 27 mai 2019

<http://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.05.007>



Review

Focus on TRP channels in cystic fibrosis

T



Chloé Grebert, Frederic Becq, Clarisse Vandebrouck

Laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, Université de Poitiers, 86073 Poitiers Cedex 9, France

ARTICLE INFO

Keywords:

TRP channels
CFTR channels
Calcium signal
Magnesium
Inflammatory response

ABSTRACT

The Transient Receptor Potential (TRP) protein superfamily is a group of cation channels expressed in various cell types and involved in respiratory diseases such as cystic fibrosis (CF), the genetic disease caused by CF Transmembrane conductance Regulator (CFTR) mutations. In human airway epithelial cells, there is growing evidence for a functional link between CFTR and TRP channels. TRP channels contribute to transmitting ex-tracellular signals into the cells and, in an indirect manner, to CFTR activity via a Ca^{2+} rise signaling. Indeed, mutated CFTR-epithelial cells are characterized by an increased Ca^{2+} influx and, on the opposite, by a decreased of magnesium influx, both being mediated by TRP channels. This increasing cellular Ca^{2+} triggers the activation of calcium-activated chloride channels (CaCC) or CFTR itself, via adenylyl cyclase, PKA and tyrosine kinases activation, but also leads to an exaltation of the inflammatory response. Another shortcoming in mutated CFTR-epithelial cells is a $[\text{Mg}^{2+}]_i$ decrease, associated with impaired TRPM7 functioning. This deregulation has to be taken into consideration in CF physiopathology, as Mg^{2+} is required for ATP hydrolysis and CFTR activity. The modulation of druggable TRP channels could supplement CF therapy either an anti-inflammatory drug or for CFTR potentiation, according to the balance between exacerbation and respite phases. The present paper focus on TRPA1, TRPC6, TRPM7, TRPV2, TRPV4, TRPV6 and ORAI 1, the proteins identified, for now, as dysfunctional channels, in CF cells.

1. Introduction

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease, due to CF Transmembrane conductance Regulator (CFTR) gene mutations, which is characterized by abnormal ion transport across the apical plasma membrane (PM) of epithelial tissues, including the airways [1]. CFTR is a plasma membrane protein that belongs to ATP binding cassette superfamily. It is a cAMP- and ATP-regulated channel which ensures, among others, Cl^- and bicarbonate transports. The most common CF mutation F508del-CFTR is the deletion of phenylalanine at position 508 leading to chloride impermeability in many exocrine glands (salivary, airways, pancreas) associated to reduced volume of the final secretory fluid [1–4]. Several studies described a non-intuitive consequence of CFTR mutation, which is important deregulation of Ca^{2+} homeostasis in CF cells. Ca^{2+} signaling deregulations were observed in several epithelial cell lines and also in primary epithelial cells [5,6]. This CF abnormal Ca^{2+} phenotype takes great importance in the CF physiopathology. First, CFTR protein expression is affected by an increased in in-tracellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ which down-regulate the CFTR mRNA level [7]. Second, the rise of intracellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ involves changes in immune and respiratory responses. It has been shown that Ca^{2+} entry in CF neutrophils, especially via TRP channels, is responsible for a reduced

antimicrobial response [8]. An increased inflammatory response mediated by a rise in intracellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signaling has also been re-reported in primary cells exposed to luminal inflammatory mediators [9]. Last, it has recently been shown that the increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is involved in CFTR internalization [10].

Virtually every eukaryotic cell expresses at least some type of calcium channel, in the plasma membrane, in intracellular organelles, or typically both. Plasma membrane calcium channels are regulated by membrane voltage or by ligands, and in some cases by both. Not surprisingly, voltage-activated channels are generally encountered in cells that depend largely on excitable behavior, for example, muscle and nerve. Calcium channels that are activated by ligands are more broadly distributed but are the exclusive mediators of transmembrane calcium flux in non-excitable cells, for example, blood cells and epithelial cells. Among all the cationic channels involved in the physiology of non-excitable cells, the family of TRP (Transient Receptor Potential) channels is an important player in calcium homeostasis. TRP channels were discovered in the eye of the *Drosophila melanogaster* fly and named for their transient response to bright light. There are 28 mammalian TRP subunits, categorized into six related protein subfamilies, based on sequence homology [11]. TRP ion channels are widely expressed throughout the body and can respond to an important diversity of

Corresponding author.

E-mail address: clarisse.vandebrouck@univ-poitiers.fr (C. Vandebrouck).<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.05.007>Received 24 February 2019; Received in revised form 27 May 2019; Accepted 27 May 2019
Available online 30 May 2019

0143-4160/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1
Detection of TRP channel activity in the airway.

Lung cell	TRPA1	TRPC6	TRPM7	TRPV2	TRPV4	TRPV6
Epithelial cells	X	X	X		X	X
Macrophages		X		X		
Smooth muscle cells		X			X	
Neutrophils		X				
Alveoli					X	
References	[15]	[21,22]	[32]	[84]	[34,35,36,37,38]	[59]

Table 2
Comparison of TRP function in CF versus non-CF cells.

	Channels Function in CF vs non-CF	References
TRPA1	≈	[15]
TRPC6		[22]
ORAI1-STIM1		[28]
TRPM7		[32]
TRPV2		[84]
TRPV4		[47]
TRPV6		[59]

intracellular and extracellular stimuli. This ability to be activated by seemingly disparate mechanisms has led to the perception of TRP channels as multiple signal integrators. The TRP channel superfamily comprises a group of cation-selective proteins, which displays a general preference for calcium ions. Moreover, the TRP channel family has been implicated in the pathogenesis of relevant chronic respiratory diseases such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), chronic cough, nonallergic rhinitis or/and apneic responses [12].

The aim of this review is to describe the TRP channels, which have been explored in more depth regarding their role in physiological and pathological mechanisms in cystic fibrosis airway epithelial cells (TRPA1, TRPC6, TRPV4, TRPV6, and TRPM7).

2. TRPA1 channels

Human TRPA1 channels were first isolated from cultured fibroblasts [13] and originally named ANKTM1 due to a large number of ankyrin repeat domains. Only one homolog of the ankyrin subfamily has been identified in mammals. TRPA1 is a calcium-permeable non-selective cation channel belonging to the large TRP family of ion channels [14]. TRPA1 has important functions in the lung and upper airways (Table 1).

Prandini et al. [15] were the first to investigate the role of TRPA1 channels in CF. They found that TRPA1 channels modulate the inflammatory response of CF bronchial epithelia induced by exposure to planktonic bacterium or supernatant of mucopurulent material, re-simulating acute or chronic infection by *P. aeruginosa* [15]. Moreover, they showed that direct activation of TRPA1 with agonists is sufficient to induce the release of IL-8 in small airway epithelial cells [16]. Based on these observations, it was proposed that TRPA1 could represent a druggable target to control the excessive inflammation reported in the lungs of CF patients, reducing tissue damage without completely blunting the immune response. To support this hypothesis, it was shown that inhibition of TRPA1 calcium transport by selective antagonists and transient reduction of protein expression by gene silencing significantly reduces the transcription and release of different cytokines, including IL-8, IL-1β, and TNF-α [15]. Whether pharmacological inhibition of TRPA1 channels in airway epithelial cells could provide significant amelioration of CF lung inflammation remains yet unknown but it would be interesting to test new molecules able to target this channel, as TRPA1 blockers could improve respiratory

disorders such as chronic cough, asthma, COPD and allergic rhinitis [17].

3. TRPC6 channels

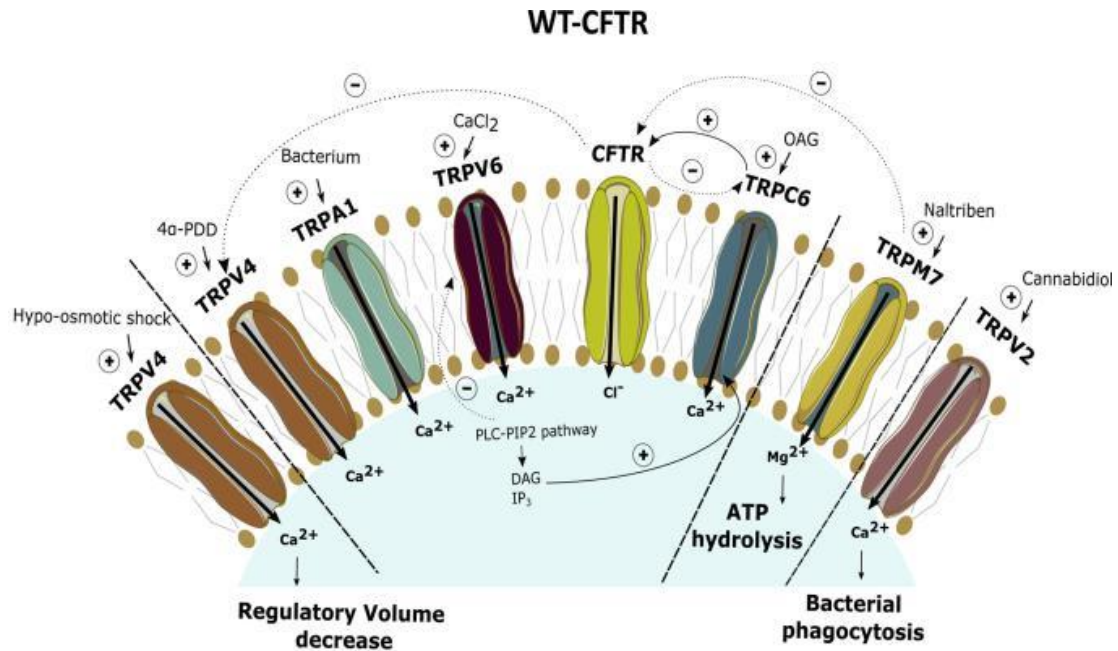
Human and mouse TRPC6 cDNAs were originally isolated from the pancreas [18] and it turns out that TRPC6 expression is the highest in the lung and brain [19]. In the context of respiratory diseases, TRPC6 channels appear to play a role in different cell types like neutrophils, macrophages and smooth muscle cells (reviewed in [20] and Table 1).

TRPC6 mRNA is also expressed in well-differentiated human bronchial epithelial cells [21] and TRPC6-mediated Ca²⁺ influx was reported to be significantly increased in CF human airway epithelial cells compared to non-CF cells when exposed to 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG), a membrane-permeable diacylglycerol analog that activates TRPC6 [22]. In CF cells expressing F508del-CFTR, specific silencing of TRPC6 reduced the abnormal Ca²⁺ influx response. Indeed, TRPC6-mediated Ca²⁺ influx, but not TRPC6 expression, is increased in CF cell lines expressing G551D-CFTR and F508delCFTR [22,23].

A correlation between abnormal Ca²⁺ homeostasis in CF cells and the expression of CFTR at the cell membrane was evidenced [23]. When CFTR is resident at the cell surface as it is the case for WT and rescued F508del-expressing CHO cells, abnormal Ca²⁺ influx induced by OAG is normalized [23]. Moreover, specific CFTR silencing in WT-CFTR expressing cells increases TRPC6-mediated Ca²⁺ influx [22], whereas CFTR activation by forskolin reduced by 30% the OAG-Ca²⁺ activity [23], showing that plasma-membrane activity of CFTR is required to down-regulate OAG-dependent Ca²⁺ influx. Antigny et al. related a direct link between TRPC6 and WTCFTR using co-immunoprecipitation studies, confirming this hypothesis. But it has also been shown that TRPC6 silencing diminished CFTR activity [22] and that OAG potentiates forskolin-dependent activation of CFTR [23] in WT-CFTR expressing cells. The authors stated a reciprocal functional coupling between these two channels in which CFTR down-regulates OAG-dependent-Ca²⁺ influx and this Ca²⁺ influx up-regulates CFTR-dependent Cl⁻ transport. Indeed, not only the upregulation of CFTR-WT activity was measured by enhancing OAG Ca²⁺ influx in non-CF cells, but in addition upregulation of G551D-CFTR activity was measured following activation of TRPC6 by OAG in the presence of the therapeutic agent VX-770 (Ivacaftor), an activator of G551D-CFTR [23]. In CF epithelial cells, guanabenz, an α2-selective adrenergic agonist, transiently increased [Ca²⁺]_i via an influx of the extracellular Ca²⁺ which stimulates CaCC [24]. TRPC6 channel is pivotal for the activation of CaCC by guanabenz through an α2-adrenergic-independent pathway suggesting a functional coupling between TRPC6 and CaCC channels [25]. A small molecule, (R)-roscovitine, (first identified in chemotherapeutics) rescues phagocytic function in CF pulmonary macrophages, independently of either kinase inhibition or CFTR expression [26]. The authors show that the TRPC6 calcium-permeable channel in the alveolar macrophages (AM) functions to shunt the transmembrane potential generated by proton pumping and is capable of restoring microbicidal function to compromised AMs in CF and enhancement of function in non-CF cells. TRPC6 channel activity is enhanced via translocation to the cell surface in response to G-protein signaling activated by (R)-roscovitine. These data show that enhancing vesicular insertion of the TRPC6 channel to the plasma membrane may represent a general mechanism for restoring phagosome activity in conditions, where it is lost or impaired.

4. The Orai1-STIM1-TRPC complexes

In addition to the family of TRPC channels involved in the Ca²⁺ influx into non-excitable cells, there are the ORAI channels. These channels are activated in response to cell stimulation and Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum (ER). The protein that conveys the Ca²⁺ content of the ER to the plasma membrane is the ER Ca²⁺ sensor



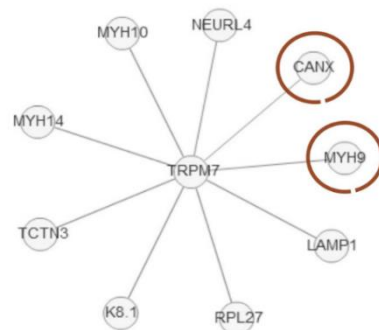
(caption on next page)

protein stromal interaction1 (STIM1) (for review [27]). A study examined the novel hypothesis that store-operated calcium entry (SOCE) through Orai1 is abnormal in CF [28]. The authors suggest that F508del-CFTR cells have enhanced calcium entry which would be mediated by the ER-resident Ca^{2+} sensor STIM1 and the Ca^{2+} release-activated channel Orai1 [28]. They showed that either WT-CFTR or

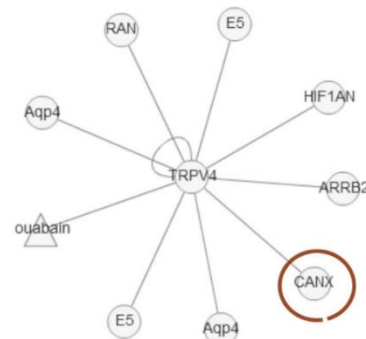
F508del-CFTR corrected is sufficient to restore SOCE. Indeed, PM ex-expression of CFTR is the only way to regulate SOCE because the use of forskolin or CFTRinh172 did not affect this calcium increase. In fact, the elevated Ca^{2+} signaling is caused by an increase in the exocytotic insertion of Orai1 into the PM. The SOCE increased in CF cells enhances IL-8 secretion and may, therefore, contribute to the hyperinflammatory

Fig. 1. Overview of TRP regulation in CFTR-expressing cells suggests TRP as potential targets in cystic fibrosis. Calcium entry via TRPA1, TRPC6, TRPV4, and TRPV6 is extended in cystic fibrosis cells when stimulated with bacterium such as *P. aeruginosa*, OAG, 4 α -PDD, and CaCl₂, respectively. TRPC6 is up-regulated by DAG, serine and tyrosine phosphorylation and phosphoinositides while TRPV6 is a constitutively activated channel regulated by [Ca²⁺]_i and PLC-PIP2 pathway. The rise of intracellular calcium is followed by the production of well-identified inflammatory mediators. On the other hand, calcium entry via TRPV4 in response to hypo-osmotic shock is decreased in CF cells. Moreover, calcium entry via TRPV2 in CF macrophages and magnesium entry via TRPM7 in CF cells is diminished when stimulated by cannabidiol or naltriben, respectively, compared to non CF cells. As magnesium is required for ATP hydrolysis, the consequence is a decrease of CFTR activity. This calcium raise and magnesium fall globally support the inflammatory state in cystic fibrosis cells. The different models used in these studies are summarized below: TRPV4: CF tracheal epithelial cell line CFT1 obtained from a CF F508del/F508del patient, HEK cell line and CFBE cell lines for the hypotonic shock response and mouse CFTR^{+/+}, mouse CFTR^{-/-}, bronchial NCI-H292 epithelial cell lines, non-CF MM39 epithelial cell line, CF-KM4 epithelial cell line for the 4 α -PDD activation; TRPA1: Human A549 alveolar type II-derived epithelial cells, CuFi-1 transformed bronchial epithelial cell line from a CF patient with F508del/F508del genotype; TRPV6: CF human epithelial cell line CFBE41o-, non-CF human epithelial cell line 16HBE14o-, primary human airway epithelial cells from a CF patient (CF hAEC) and a non CF patient (hAEC); TRPC6: human non-CF epithelial cell line MM39, human CF epithelial cell line CF-MK4, CHO cell line over-expressing F508del-CFTR, G551D-CFTR or WT-CFTR; TRPM7: HeLa cell line overexpressing F508del-CFTR, G551D-CFTR or WT-CFTR; TRPV2: primary human macrophages from non-CF and CF patients.

9 proteins interact with TRPM7



8 proteins interact with TRPV4



149 proteins interact with CFTR

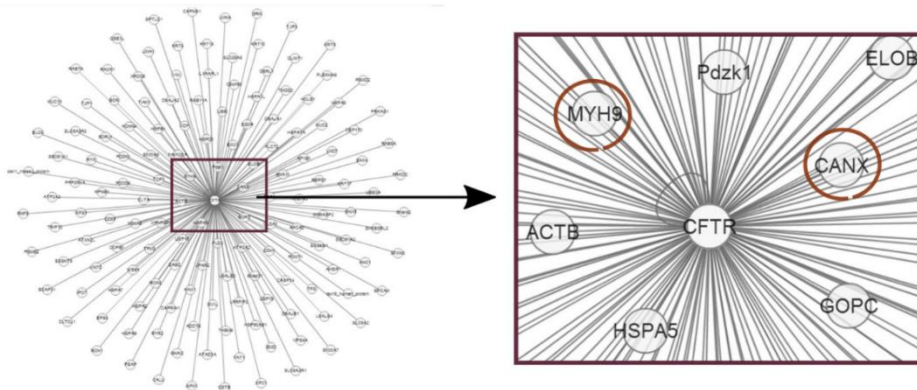


Fig. 2. Binary interactions reported with each TRPM7, TRPV4 and CFTR channels suggest a physical link between CFTR and TRPs. IntAct Molecular Interaction Database reported 9 protein interactions with TRPM7, 8 protein interactions with TRPV4 and 149 protein interactions with CFTR. Among the protein identified in complex with CFTR, myosin-9 is also interacting with TRPM7 and calnexin is linked both with TRPM7 and TRPV4.

state that characterizes CF [28].

5. TRPM7 channels

TRPM7 is remarkable in that it constitutes the fusion between a cation channel and a functional C-terminal serine/threonine-protein kinase domain (for review [29]). The tissue distribution of TRPM7 is

ubiquitous, but expression levels in the human sample are the highest in heart, liver, bone and adipose tissue [30]. The TRPM7 channel is non-selective but predominantly permeates the divalent cations Ca²⁺ and Mg²⁺ under physiological conditions [31]. Consistent with its multi-functional nature, TRPM7 has been proposed to function in several fundamental physiological processes, including Mg²⁺ homeostasis, cell proliferation, cell motility and cellular differentiation (for review [29]).

TRPM7 altered expression or activity is associated with a number of pathological conditions, including cancer, cardiovascular defects and neurodegenerative diseases (for review [29]).

Huguet et al. [32] studied the expression, the function and the channel regulation of TRPM7 by $[Mg^{2+}]_i$ in non-transfected HeLa cells and in HeLa cells expressing WT-CFTR or mutated CFTR (F508del-CFTR and G551D-CFTR). In both F508del-CFTR and G551D-CFTR cells the protein expression of TRPM7 was increased whereas its function was reduced compared to WT-CFTR cells. Interestingly, Mg^{2+} had no effect on the channel regulation in these mutated cells, while it usually inhibits TRPM7 activity. As Mg^{2+} is required for CFTR activity through ATP hydrolysis, they measured $[Mg^{2+}]_i$ in cells expressing WT-CFTR, F508del-CFTR, and G551D-CFTR. They showed that $[Mg^{2+}]_i$ is decreased in cells expressing F508del-CFTR and G551D-CFTR. Then, in order to highlight a possible functional link between TRPM7 and CFTR, TRPM7 activity was pharmacologically increased by the use of naltriben, and the function of CFTR was studied in cells expressing WT-CFTR, F508del-CFTR, and G551D-CFTR. The authors found that the activation of TRPM7 by naltriben resulted in a decreased CFTR function in WT-CFTR and F508del-CFTR cells but in a highly increased function in cells expressing G551D-CFTR. Mg^{2+} and Ca^{2+} flux through TRPM7 were found to be modulated in cells expressing mutated CFTR compared to cells expressing WT-CFTR. The authors concluded that the link between TRPM7 and CFTR varies with the type of CFTR mutation and proposed naltriben as a new potentiator of G551D-CFTR, with potential implications for CF therapy [32].

6. TRPV4 channels

TRPV4 was originally isolated from rat kidney, and identified as a vertebrate homolog of the *Caenorhabditis elegans* gene *Osm-9*, with sequence homology similar to TRPV1 and TRPV2 channels [33]. TRPV4 is expressed in a wide range of tissues including heart, lung, kidney, DRG neurons, CNS, skin and sweat glands, with the most prominent expression found in epithelial and endothelial cells [33]. In the airways, TRPV4 channels are expressed in smooth muscles, alveolar wall, lung tissue and lung vessels [34–37], with the highest levels of expression in the epithelial linings trachea, bronchi, and lower airways, and in the alveolar septal walls [34,38,39] (Table 1). Interestingly, data is now emerging suggesting that there are genetic variants of TRPV4, which may be associated with the pathophysiology and symptomatology of asthma and COPD [40].

Human airway epithelia show a typical Ca^{2+} -dependent regulatory volume decrease (RVD) under hypotonic conditions [41], but this RVD response is lost in CF airways [42]. The cellular defect associated with the impaired RVD in CF epithelia is mainly linked to the dysfunction of volume-sensitive K^+ channels [42–45], although defective swelling-activated Cl^- channels have also been reported [46]. It has been proposed that the dysfunction of K^+ channels required for the RVD response might be related to the lack of a Ca^{2+} signal in CF epithelia, at least in the airway and small intestine epithelia [42,44,45]. Several studies by the group of Valverde demonstrated that the TRPV4 channel is the only pathway mediating the swelling-activated Ca^{2+} entry required to achieve a full RVD in human tracheal epithelial cells. Moreover, they have shown that the impaired RVD response in CF airway epithelia is caused by misregulation of TRPV4, suggesting that the hypotonic activation of TRPV4 channels is CFTR-dependent [47]. TRPV4 activation by hypotonic stress emerges as a key process in the control of cell volume in human airway epithelial cells, but it is impaired in CF airway epithelial cells, leading to defective RVD response [42,47]. The misregulation of TRPV4 channels may be relevant to the pathophysiology of CF in different ways. It might contribute to the increased Na^+ absorption described in CF airway epithelia [48]. Na^+ absorption is reduced by stimuli causing cytosolic Ca^{2+} increases [49]. Therefore, a defective TRPV4 channel might result in a reduced mechanically induced Ca^{2+} signal and in increased amiloride-sensitive

Na^+ absorption. More recently, in vitro and in vivo evidence for an inflammatory role of TRPV4 in lung epithelium has been proposed [50]. The authors observed that four natural lipid-based TRPV4 agonists are present in expectorations of CF patients. Also, TRPV4-induced calcium mobilization and inflammatory responses were enhanced in CFTR-deficient cellular and animal models [50].

7. TRPV5 and TRPV6 channels

TRPV5 and TRPV6 constitute a distinct class of highly Ca^{2+} -selective channels within the TRP superfamily, which encompasses a diversity of non-voltage operated cation channels [51]. In humans, both channels are co-expressed in organs that mediate transcellular Ca^{2+} transport such as duodenum, jejunum, colon, and kidney, but also in the pancreas, prostate, mammary, sweat and salivary glands [51–53]. TRPV5 appears to be the major isoform in the kidney, whereas TRPV6 is more ubiquitously expressed with the highest concentrations in the prostate, stomach, brain, lung and small intestine. Ca^{2+} -selective TRPV6 channels are constitutively active [54] and play a critical role in calcium uptake in epithelial tissues [53,55]. TRPV6 KO mice exhibit disordered Ca^{2+} homeostasis, including defective intestinal Ca^{2+} absorption, increased urinary Ca^{2+} excretion, deficient weight gain, and reduced fertility, suggesting the pivotal role in Ca^{2+} homeostasis in tissues where this channel is expressed. TRPV6 is also expressed in epididymal epithelium where the protein was detected in the apical membrane [56]. The authors also found that male, but not female, mice homozygous for the mutation D541A on TRPV6 gene, which expressed a nonfunctional channel, showed severely impaired fertility. Altered TRPV6 expression is associated with a variety of human diseases [57], including cancers [58]. However, less is known about TRPV5 and TRPV6 expression and roles in airway epithelia.

TRPV5 and TRPV6 are both endogenously expressed in CF and non-CF epithelial cells [59] (Table 1). Compared to non-CF airway epithelial cells, the constitutive Ca^{2+} activity is increased two-fold in CF cells. Using pharmacological and siRNA strategies, it was demonstrated that TRPV6 is mostly responsible for this abnormal increase of Ca^{2+} influx. To further investigate the mechanism underlying this dysregulation, the authors focused on the negative feedback of phospholipase C (PLC)-PIP2 pathway on TRPV6 activity. Using PLC inhibitors they demonstrated that the decrease of PLC activity leads to an increase of constitutive Ca^{2+} influx in bronchial epithelial cells. Moreover, the diminished expression of the specific PLC- $\delta 1$ isoform confirmed the implication of the PLC-PIP2 pathway on TRPV6 regulation in bronchial epithelial cells. Interestingly, F508del-CFTR rescue by low temperature-induced a normalization of TRPV6 activity whereas the inhibition of TRPV6 had no impact on the activity of WT-CFTR and F508del-CFTR corrected or not. Moreover, PLC- $\delta 1$ protein expression level was not modified after F508del-CFTR correction, suggesting that the protein quantity is not the only factor that could explain the implication of this enzyme in the increase of TRPV6 activity cells [59]. The constitutive calcium influx is increased in CF cells, mostly due to the upregulation of TRPV6 activity. Vachel et al. [59] hypothesized that i) the decrease of the PLC- $\delta 1$ isoform expression contributes to dysregulation of TRPV6 channels in CF cells and that ii) PLC- $\delta 1$ protein intracellular localization may have an impact on the regulation of TRPV6 activity. The reduced expression of this intracellular mediator could have a larger influence by interfering with CFTR protein regulation and cytoskeletal organization in CF cells [59]. The abnormal Ca^{2+} influx through the TRPV6 channel could also participate in CF inflammation clinical features by increasing exacerbation via cytokine secretion.

8. Role of TRPs in the response of airway epithelial cells to environmental factors

Obstructive lung diseases such as CF and COPD are causes of high morbidity and mortality worldwide. CF is a multiorgan genetic disease

and is characterized by progressive chronic obstructive lung disease. Most cases of COPD are a result of noxious particles, mainly cigarette smoke but also other environmental pollutants. Although the pathogenesis and pathophysiology of CF and COPD differ, they do share key phenotypic features and because of these similarities, there is great interest in exploring common mechanisms and/or factors affected by CFTR mutations and environmental insults involved in COPD. In this context of as yet poorly understood molecular and cell signaling specificity leading to respiratory diseases, in recent years there has been a continuously growing interest to various members of TRP channels, many of which can rather specifically detect a diverse array of physical and chemical stimuli, such as mechanical forces, temperature changes, pH, osmolarity, noxious compounds, reactive oxygen and nitrogen species [60].

The cold-activated TRPA1 and TRPM8 and the heat-activated TRPV1 channels have received much interest in the studies of the respiratory system and its disease states [60]. These channels can modulate the action of thermal irritants, such as inhalation of cold air that can provoke coughing, especially in respiratory virus-induced cough hypersensitivity [61]. A recently identified association between six TRPV1 single nucleotide polymorphisms (SNP) and a higher risk for chronic cough in patients with enhanced susceptibility to cough [62] further strengthens the proposal that TRPV1 is a pathophysiological target for treating patients. However, it has also been reported that a loss of function single-point mutation of TRPV1 (TRPV1-I585V) produced a more severe cough phenotype [63]. Pharmacological studies showed that chemical irritants activate TRPA1 in the airways and produce asthma-like symptoms, as well as heightened responses to chemical and physical stimuli [64–67]. Pharmacological and knockout studies revealed that TRPA1 mediates the inflammatory effects of chemical irritants [68]. The expression and function of the cold- and menthol receptor TRPM8 in the airways has been addressed in several studies, but the data still remains somewhat controversial (see [66,69] for reviews). For example, the available pharmacological tools make it difficult to distinguish between the effects of TRPA1 or TRPM8 activation. It is, however, clear that rhinovirus upregulates expression of neuronal TRPM8 in a manner distinct from TRPV1 and TRPA1, and this implies TRPM8 contribution to virus-induced cough hypersensitivity [61]. Finally, *ex vivo* data, showing activation of vagal nerve fibers following TRPV4 stimulation [70] may represent the neurophysiological basis for the ability of the TRPV4 agonists to evoke sensory nerve firing, and the cough in a conscious guinea pig model [70]. However, which possibly endogenous stimulus might cause cough by targeting TRPV4 remains to be determined.

The environmental factors, as pollutants or smoke, are aggravating factors for CF patients, and then it could be interesting to study in-depth the role of these TRP channels in order to find new therapies and improve the care of these patients.

9. TRPs and airway smooth muscle dysfunction

The airways are built of the epithelium, smooth muscle, and connective tissue (fibroblasts), with an important contribution of sensory nerves and resident immune cells. The pulmonary vasculature consists of endothelial cells, smooth muscle, and connective tissue. TRP channels are expressed in all of these tissues and cells [71] and there is good evidence that they play a pivotal role in the development and maintenance of chronic lung diseases, ranging from chronic cough through COPD and asthma to idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [72].

Both exogenous and endogenous stimuli activate TRP channels, which include the release of inflammatory mediators and neuropeptides, contraction of smooth muscle, hypersecretion of mucus, and altered permeability; this eventually results in cough, chronic inflammation, lung injury, airway remodeling, and bronchoconstriction. TRPV1, TRPV4, and TRPA1 are all expressed in smooth muscle cells [73–75] and they are involved in bronchoconstriction, but via different

pathways [76–78]. TRPV4-mediated bronchoconstriction is almost totally dependent on cysteinyl leukotrienes [79]. Activation of TRPV1 and TRPV4 induces contraction of ASM, but activation of TRPA1 by acrolein results in bronchial relaxation, reportedly via the release of PGE2 [80,81].

The involvement of some TRPs in ASM cells makes them new therapeutic targets for modulating bronchoconstriction in CF patients.

10. Role of TRPs in CF-affected tissues other than the airways

Cystic fibrosis is a disease of exocrine gland function that involves multiple organ systems but results in chronic respiratory infections, pancreatic enzyme insufficiency, and associated complications in untreated patients. Recent reports describe a fundamental role of TRP channels in intestinal epithelial cells in mediating cytokine/chemokine release as well [82]. Many TRP channels are expressed in various immune cells, especially in macrophages and T cells. Here, they modulate many functions such as cytokine expression and release, migration, or phagocytic activity. Moreover, in the epithelial layer, TRP channels expression was also found to be relevant in the pathogenesis of many inflammatory disorders, mainly through controlling chemokine/cytokine expression and release. Thus, a vital interplay between neurons, epithelial, and mucosal immune cells seems to maintain homeostasis in different organs, for example, the gut, the lung, and the vascular system and disruption of one or more of these players may induce disease (for review [83]).

In CF, macrophages have lost their capacity to act as suppressor cells and thus play a significant role in the initiating stages leading to chronic inflammation/infection. Levêque et al. [84] showed that *Pseudomonas aeruginosa* recruits TRPV2 channels at the cell surface and induced a calcium influx required for bacterial phagocytosis. CF macrophages display perturbed calcium homeostasis due to a defect in TRPV2. In this context, deregulated TRPV2-signaling in CF macrophages could explain their defective phagocytosis capacity that contributes to the maintenance of chronic infection. Therefore, TRPV2 might be considered as a new target to restore phagocytosis capacity of CF macrophages and to improve the innate immune defense of patients with CF [84].

Patients with CF are highly susceptible to infections caused by opportunistic pathogens (including *Burkholderia cenocepacia*), which induce excessive lung inflammation and lead to the eventual loss of pulmonary function. Abundant neutrophil recruitment into the lung is a key characteristic of bacterial infections in CF patients. In response to infection, inflammatory neutrophils release reactive oxygen species and toxic proteins, leading to aggravated lung tissue damage in patients with CF. Robledo-Avila et al. [8] show a defect in reactive oxygen species production by CF neutrophils. Furthermore, dysregulated Ca^{2+} homeostasis led to increased intracellular concentrations of Ca^{2+} that correlated with significantly diminished NADPH oxidase response and impaired secretion of neutrophil extracellular traps in human CF neutrophils. Functionally deficient human CF neutrophils recovered their antimicrobial killing capacity following treatment with pharmacological inhibitors of Ca^{2+} channels and CFTR channel potentiators. TRPM2 and TRPM7 channels may regulate Ca^{2+} overloading in phagocytic cells [85,86], it is speculated that systemic pharmacological inhibition of these channels may help in restoring Ca^{2+} homeostasis and recovering the antimicrobial capacity in phagocytic cells [8]. This study suggests that regulation of neutrophil Ca^{2+} homeostasis (via CFTR potentiation or by the regulation of Ca^{2+} channels) can be used as a new therapeutic approach for reestablishing immune function in patients with CF.

11. Role of CFTR in TRP channels regulation: general findings

Although functional coupling has not been investigated yet between CFTR and all the TRPs, we can bring some general findings to answer why TRP channels are disturbed in CF cells (Table 2). First,

CFTR is known as a regulatory protein of several ion channels. It has been suggested that CFTR down-regulates ENaC [87–89] and CaCC [90,91] but up-regulates ROMK channels [92] and ORCC [93]. A functional link has been identified between WT-CFTR and two TRP channels as well (Fig. 1). Indeed, WT-CFTR down-regulates both TRPV4 and TRPV6 but with F508del-CFTR mutation, calcium fluxes mediated by these TRPs increase. In a different way, TRP channels can also regulate CFTR as it was experienced with TRPM7. In the presence of the TRPM7 activator naltriben, Huguët et al. [31] found lower activities of WT-CFTR and F508del-CFTR but a higher activity of G551D-CFTR, suggesting that TRPM7 activation generally down-regulates WT-CFTR in absence of cystic fibrosis disease. Second, differences in protein expression of TRP channels have been related with F508delCFTR mutation compared to WT-CFTR: Huguët et al. [32] noticed an increased TRPM7 expression in F508del-CFTR HeLa cells whereas Levêque et al. [84] showed a decreased TRPV2 expression in CF macrophages from human patients. Balghi et al. [28] also revealed that F508del-CFTR mutation is associated with ORAI1 increased surface expression. It turns out that CFTR mutations clearly modify some protein channels expression. CFTR and TRPs, as membrane proteins, are using similar trafficking pathways from the ER to the plasma membrane after their synthesis [94]. They are both able to follow the constitutive exocytotic pathway or the regulated exocytotic pathway to reach the PM, through a host of protein-protein interactions [95]. Furthermore, CFTR and TRP channels both interact with SNAREs protein family, which allows vesicle targeting and fusion at PM. F508del-CFTR follows an unconventional trafficking/secretion mediated by proteins that differs from the conventional trafficking which concerns WT-CFTR channels [96,97].

Third, even though direct interactions between CFTR and TRP channels have not been identified yet, indirect interactions mediated by regulatory complex could be proposed. The interaction network between the seven TRP channels and CFTR was assessed with the online tool: IntAct Molecular Interaction Database (<https://www.ebi.ac.uk/interact/>) (Fig. 2). CFTR has many protein interactors, about 149 binary interactions have been reported until now, and CFTR interactome is studied with many interests [98,99]. The calcium-binding chaperone protein calnexin has been identified as a partner of TRPM7, TRPV4, and CFTR. Myosin-9 protein has been identified as a partner of TRPM7 and CFTR and has been related at the plasma membrane porosome complex of human airway Calu-3 cells [98].

As a matter of fact, we suppose that WT-CFTR indirectly controls TRP channels activity or expression in different ways, either per trafficking pathways and plasma membrane localization or per interacting proteins complexes. F508del-CFTR mutation possibly modifies cellular contents that usually connect CFTR and TRP channels.

12. Conclusions

Significant progress has been made in recent years in delineating the distribution and roles of TRP channels in various cell types under both physiological and pathophysiological conditions. It is already well established that TRP channels are important players in the pathogenesis of several human diseases, including in the respiratory field. The application of gene knockdown approaches and the recent development of selective pharmacological tools to probe TRP channel function [100] should promote our understanding and knowledge of the link between TRP isoforms and epithelial function and dysfunction in CF. Potential liabilities that may be associated with altering channel function might be discovered. Overall, in cystic fibrosis, TRP channels appear to involve an increase in intracellular Ca^{2+} and have consequences on the inflammatory response (Fig. 1). Moreover, the activity of some of these TRPs seems to influence or be influenced by CFTR. These channels can, therefore, become important therapeutic targets in this pathological context.

Conflict of interest statement

The authors reported no conflicts of interest.

Acknowledgments

Our laboratory is supported by the French associations Vaincre la Mucoviscidose (VLM) and ABCF2.

References

- [1] J.R. Riordan, The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *Annu. Rev. Physiol.* 55 (1993) 609–630.
- [2] B. Kerem, J.M. Rommens, J.A. Buchanan, et al., Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis, *Science* 245 (1989) 1073–1080.
- [3] P.M. Quinton, Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport, *FASEB J.* 4 (1990) 2709–2717.
- [4] J.M. Rommens, M.C. Iannuzzi, B. Kerem, et al., Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping, *Science* 245 (1989) 1059–1065.
- [5] F. Antigny, C. Norez, F. Becq, C. Vandebrouck, CFTR and Ca signaling in cystic fibrosis, *Front. Pharmacol.* 2 (2011) 67.
- [6] C.M. Ribeiro, The role of intracellular calcium signals in inflammatory responses of polarized cystic fibrosis human airway epithelia, *Drugs R&D* 7 (2006) 17–31.
- [7] J. Bargon, B.C. Trapnell, C.S. Chu, et al., Down-regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene expression by agents that modulate intracellular divalent cations, *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992) 1872–1878.
- [8] F.H. Robledo-Avila, J.D. Ruiz-Rosado, K.L. Brockman, et al., Dysregulated calcium homeostasis in cystic fibrosis neutrophils leads to deficient antimicrobial responses, *J. Immunol.* 201 (2018) 2016–2027.
- [9] C.M. Ribeiro, A.M. Paradiso, U. Schwab, et al., Chronic airway infection/inflammation induces a Ca^{2+} -dependent hyperinflammatory response in human cystic fibrosis airway epithelia, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 17798–17806.
- [10] W. Patel, P.J. Moore, M.F. Sassano, et al., Increases in cytosolic Ca^{2+} induce dynamin- and calcineurin-dependent internalisation of CFTR, *Cell. Mol. Life Sci.* (2018).
- [11] D.E. Clapham, TRP channels as cellular sensors, *Nature* 426 (2003) 517–524.
- [12] H. Wallace, Airway Pathogenesis is Linked to TRP Channels, (2017), pp. 251–264.
- [13] D. Jaquemat, T. Schenker, B. Trueb, An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 7325–7333.
- [14] D. Julius, TRP channels and pain, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29 (2013) 355–384.
- [15] P. Prandini, L.F. De, C. Fusi, et al., Transient receptor potential ankyrin 1 channels modulate inflammatory response in respiratory cells from patients with cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 55 (2016) 645–656.
- [16] R. Nassini, P. Pedretti, N. Moretto, et al., Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation, *PLoS One* 7 (2012) e42454.
- [17] I. Mukhopadhyay, A. Kulkarni, N. Khairatkar-Joshi, Blocking TRPA1 in respiratory disorders: does it hold a promise? *Pharmaceuticals (Basel)* 9 (2016).
- [18] G. Boulay, X. Zhu, M. Peyton, et al., Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 29672–29680.
- [19] C. Montell, The TRP superfamily of cation channels, *Sci. STKE* 2005 (2005) re3.
- [20] S. Li, J. Westwick, C. Poll, Transient receptor potential (TRP) channels as potential drug targets in respiratory disease, *Cell Calcium* 33 (2003) 551–558.
- [21] R.L. Corteling, S. Li, J. Giddings, J. Westwick, C. Poll, I.P. Hall, Expression of transient receptor potential C6 and related transient receptor potential family members in human airway smooth muscle and lung tissue, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30 (2004) 145–154.
- [22] F. Antigny, C. Norez, L. Dannhoffer, et al., Transient receptor potential canonical channel 6 links Ca^{2+} mishandling to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel dysfunction in cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44 (2011) 83–90.
- [23] L. Vachel, C. Norez, F. Becq, C. Vandebrouck, Effect of VX-770 (ivacaftor) and OAG on Ca^{2+} influx and CFTR activity in G551D and F508del-CFTR expressing cells, *J. Cyst. Fibros.* 12 (2013) 584–591.
- [24] C. Norez, C. Vandebrouck, F. Antigny, L. Dannhoffer, M. Blondel, F. Becq, Guanabenz, an α 2-selective adrenergic agonist, activates Ca^{2+} -dependent chloride currents in cystic fibrosis human airway epithelial cells, *Eur. J. Pharmacol.* 592 (2008) 33–40.
- [25] J. Bertrand, L. Dannhoffer, F. Antigny, et al., A functional tandem between transient receptor potential canonical channels 6 and calcium-dependent chloride channels in human epithelial cells, *Eur. J. Pharmacol.* 765 (2015) 337–345.
- [26] V. Riazanski, A.G. Gabdoulkhakova, L.S. Boynton, et al., TRPC6 channel translocation into phagosomal membrane augments phagosomal function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) E6486–E6495.
- [27] D. Bodnar, W.Y. Chung, D. Yang, J.H. Hong, A. Jha, S. Muallem, STIM-TRP pathways and microdomain organization: Ca^{2+} influx channels: the Orai-STIM1-TRPC complexes, *Adv. Exp. Med. Biol.* 993 (2017) 139–157.
- [28] H. Balghi, R. Robert, B. Rappaz, et al., Enhanced Ca^{2+} entry due to Orai1 plasma membrane insertion increases IL-8 secretion by cystic fibrosis airways, *FASEB J.* 25

- (2011) 4274–4291.
- [29] D. Visser, J. Middelbeek, F.N. van Leeuwen, K. Jalink, Function and regulation of the channel-kinase TRPM7 in health and disease, *Eur. J. Cell Biol.* 93 (2014) 455–465.
 - [30] E. Fonfria, P.R. Murdock, F.S. Cusdin, C.D. Benham, R.E. Kelsell, S. McNulty, Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family, *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 26 (2006) 159–178.
 - [31] R. Penner, A. Fleig, The Mg²⁺ and Mg(2+)-nucleotide-regulated channel-kinase TRPM7, *Handb. Exp. Pharmacol.* (2007) 313–328.
 - [32] F. Huguet, M.L. Calvez, N. Benz, et al., Function and regulation of TRPM7, as well as intracellular magnesium content, are altered in cells expressing DeltaF508-CFTR and G551D-CFTR, *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (2016) 3351–3373.
 - [33] W. Liedtke, Y. Choe, M.A. Marti-Renom, et al., Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor, *Cell* 103 (2000) 525–535.
 - [34] D.F. Alvarez, J.A. King, D. Weber, E. Addison, W. Liedtke, M.I. Townsley, Transient receptor potential vanilloid 4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: a novel mechanism of acute lung injury, *Circ. Res.* 99 (2006) 988–995.
 - [35] A. Dietrich, V. Chubonov, H. Kalwa, B.R. Rost, T. Gudermann, Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells, *Pharmacol. Ther.* 112 (2006) 744–760.
 - [36] Y. Jia, X. Wang, L. Varty, et al., Functional TRPV4 channels are expressed in human airway smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 287 (2004) L272–L278.
 - [37] X.R. Yang, M.J. Lin, L.S. McIntosh, J.S. Sham, Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 290 (2006) L1267–L1276.
 - [38] J.M. Fernandez-Fernandez, Y.N. Andrade, M. Arniges, et al., Functional coupling of TRPV4 cationic channel and large conductance, calcium-dependent potassium channel in human bronchial epithelial cell lines, *Pflügers Arch.* 457 (2008) 149–159.
 - [39] R.N. Willette, W. Bao, S. Nerurkar, et al., Systemic activation of the transient receptor potential vanilloid subtype 4 channel causes endothelial failure and circulatory collapse: part 2, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326 (2008) 443–452.
 - [40] G. Cantero-Recasens, J.R. Gonzalez, C. Fandos, et al., Loss of function of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) genetic variant is associated with lower risk of active childhood asthma, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 27532–27535.
 - [41] J.M. Fernandez-Fernandez, M. Nobles, A. Currid, E. Vazquez, M.A. Valverde, Maxi K + channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283 (2002) C1705–C1714.
 - [42] E. Vazquez, M. Nobles, M.A. Valverde, Defective regulatory volume decrease in human cystic fibrosis tracheal cells because of altered regulation of intermediate conductance Ca²⁺-dependent potassium channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 5329–5334.
 - [43] R. Belfodil, H. Barriere, I. Rubera, et al., CFTR-dependent and -independent swelling-activated K⁺ currents in primary cultures of mouse nephron, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 284 (2003) F812–F828.
 - [44] M.A. Valverde, J.A. O'Brien, F.V. Sepulveda, R.A. Ratcliff, M.J. Evans, W.H. Colledge, Impaired cell volume regulation in intestinal crypt epithelia of cystic fibrosis mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 9038–9041.
 - [45] M.A. Valverde, E. Vazquez, F.J. Munoz, et al., Murine CFTR channel and its role in regulatory volume decrease of small intestine crypts, *Cell. Physiol. Biochem.* 10 (2000) 321–328.
 - [46] H. Barriere, R. Belfodil, I. Rubera, et al., CFTR null mutation altered cAMP-sensitive and swelling-activated Cl⁻ currents in primary cultures of mouse nephron, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 284 (2003) F796–F811.
 - [47] M. Arniges, E. Vazquez, J.M. Fernandez-Fernandez, M.A. Valverde, Swelling-activated Ca²⁺ entry via TRPV4 channel is defective in cystic fibrosis airway epithelia, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 54062–54068.
 - [48] R.C. Boucher, M.J. Stutts, M.R. Knowles, L. Cantley, J.T. Gatz, Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation, *J. Clin. Invest.* 78 (1986) 1245–1252.
 - [49] M. Mall, A. Wissner, H.H. Seydewitz, et al., Defective cholinergic Cl⁻ secretion and detection of K⁺ secretion in rectal biopsies from cystic fibrosis patients, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278 (2000) G617–G624.
 - [50] C.O. Henry, E. Dalloneau, M.T. Perez-Berezo, et al., In vitro and in vivo evidence for an inflammatory role of the calcium channel TRPV4 in lung epithelium: potential involvement in cystic fibrosis, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 311 (2016) L664–L675.
 - [51] D. Himet, J. Olausson, C. Fecher-Trost, et al., The TRPV6 gene, cDNA and protein, *Cell Calcium* 33 (2003) 509–518.
 - [52] D. Muller, J.G. Hoenderop, I.C. Meij, et al., Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal mapping of the human epithelial Ca²⁺ channel (ECAC1), *Genomics* 67 (2000) 48–53.
 - [53] J.B. Peng, X.Z. Chen, U.V. Berger, et al., Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 22739–22746.
 - [54] E. den Dekkers, J.G. Hoenderop, B. Nilius, R.J. Bindels, The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation, *Cell Calcium* 33 (2003) 497–507.
 - [55] T.E. Woudenberg-Vrenken, A.L. Lameris, P. Weissgerber, et al., Functional TRPV6 channels are crucial for transepithelial Ca²⁺ absorption, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303 (2012) G879–G885.
 - [56] P. Weissgerber, U. Kriebs, V. Tsvilovskiy, et al., Male fertility depends on Ca(2+)-absorption by TRPV6 in epididymal epithelia, *Sci. Signal.* 4 (2011) ra27.
 - [57] C. Fecher-Trost, P. Weissgerber, U. Wissenbach, TRPV6 channels, *Handb. Exp. Pharmacol.* 222 (2014) 359–384.
 - [58] V. Lehen'kyi, M. Raphael, N. Prevorskaya, The role of the TRPV6 channel in cancer, *J. Physiol.* 590 (2012) 1369–1376.
 - [59] L. Vachel, C. Norez, C. Jayle, F. Becq, C. Vandebrouck, The low PLC-delta1 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells induces upregulation of TRPV6 channel activity, *Cell Calcium* 57 (2015) 38–48.
 - [60] A.V. Zholos, TRP channels in respiratory pathophysiology: the role of oxidative, chemical irritant and temperature stimuli, *Curr. Neuropharmacol.* 13 (2015) 279–291.
 - [61] H. Abdullah, L.G. Heaney, S.L. Cosby, L.P. McGarvey, Rhinovirus upregulates transient receptor potential channels in a human neuronal cell line: implications for respiratory virus-induced cough reflex sensitivity, *Thorax* 69 (2014) 46–54.
 - [62] L.A. Smit, M. Kogevinas, J.M. Anto, et al., Transient receptor potential genes, smoking, occupational exposures and cough in adults, *Respir. Res.* 13 (2012) 26.
 - [63] S.E. Jordt, D.M. Bautista, H.H. Chuang, et al., Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1, *Nature* 427 (2004) 260–265.
 - [64] A.I. Caceres, M. Brackmann, M.D. Elia, et al., A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 9099–9104.
 - [65] C.E. Deering-Rice, E.G. Romero, D. Shapiro, et al., Electrophilic components of diesel exhaust particles (DEP) activate transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1): a probable mechanism of acute pulmonary toxicity for DEP, *Chem. Res. Toxicol.* 24 (2011) 950–959.
 - [66] M.S. Grace, M. Baxter, E. Dubuis, M.A. Birrell, M.G. Belvisi, Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 2593–2607.
 - [67] D. Preti, A. Szallasi, R. Patacchini, TRP channels as therapeutic targets in airway disorders: a patent review, *Expert Opin. Ther. Pat.* 22 (2012) 663–695.
 - [68] D.M. Bautista, S.E. Jordt, T. Nikai, et al., TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents, *Cell* 124 (2006) 1269–1282.
 - [69] T. Buday, M. Brozmanova, Z. Biringirova, et al., Modulation of cough response by sensory inputs from the nose - role of trigeminal TRPA1 versus TRPM8 channels, *Cough* 8 (2012) 11.
 - [70] S.J. Bonvini, M.A. Birrell, M.S. Grace, et al., Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 and airway sensory afferent activation: Role of adenosine triphosphate, *J. Allergy Clin. Immunol.* 138 (2016) 249–261.
 - [71] M.M. Moran, M.A. McAlexander, T. Biro, A. Szallasi, Transient receptor potential channels as therapeutic targets, *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (2011) 601–620.
 - [72] R. Nassini, S. Materazzi, S.G. De, C.F. De, P. Geppetti, Transient receptor potential channels as novel drug targets in respiratory diseases, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 11 (2010) 535–542.
 - [73] G.A. Fontana, F. Lavorini, M. Pistolesi, Water aerosols and cough, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 15 (2002) 205–211.
 - [74] G.L. Piacentini, D. Peroni, E. Crestani, et al., Exhaled air temperature in asthma: methods and relationship with markers of disease, *Clin. Exp. Allergy* 37 (2007) 415–419.
 - [75] P.M. Zygmunt, A. Ermund, P. Movahed, et al., Monoacylglycerols activate TRPV1—a link between phospholipase C and TRPV1, *PLoS One* 8 (2013) e81618.
 - [76] D.C. Bolser, S.M. Aziz, R.W. Chapman, Ruthenium red decreases capsaicin and citric acid-induced cough in guinea pigs, *Neurosci. Lett.* 126 (1991) 131–133.
 - [77] S. Kikuno, K. Taguchi, N. Iwamoto, et al., 1,2-Naphthoquinone activates vanilloid receptor 1 through increased protein tyrosine phosphorylation, leading to contraction of guinea pig trachea, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 210 (2006) 47–54.
 - [78] F.L. Ricciardolo, Mechanisms of citric acid-induced bronchoconstriction, *Am. J. Med.* 111 (Suppl. 8A) (2001) 18S–24S.
 - [79] M.A. McAlexander, M.A. Luttmann, G.E. Hunsberger, B.J. Udem, Transient receptor potential vanilloid 4 activation constricts the human bronchus via the release of cysteinyl leukotrienes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 349 (2014) 118–125.
 - [80] E.Y. Cheah, P.C. Burcham, T.S. Mann, P.J. Henry, Acrolein relaxes mouse isolated tracheal smooth muscle via a TRPA1-dependent mechanism, *Biochem. Pharmacol.* 89 (2014) 148–156.
 - [81] E.Y. Cheah, T.S. Mann, P.C. Burcham, P.J. Henry, Influenza A infection attenuates relaxation responses of mouse tracheal smooth muscle evoked by acrolein, *Biochem. Pharmacol.* 93 (2015) 519–526.
 - [82] E. D'Aldebert, N. Cenac, P. Rousset, et al., Transient receptor potential vanilloid 4 activated inflammatory signals by intestinal epithelial cells and colitis in mice, *Gastroenterology* 140 (2011) 275–285.
 - [83] M. Khalil, K. Alliger, C. Weidinger, et al., Functional role of transient receptor potential channels in immune cells and epithelia, *Front. Immunol.* 9 (2018) 174.
 - [84] M. Leveque, A. Penna, S. Le Trionnaire, et al., Phagocytosis depends on TRPV2-mediated calcium influx and requires TRPV2 in lipid rafts: alteration in macrophages from patients with cystic fibrosis, *Sci. Rep.* 8 (2018) 4310.
 - [85] I. Heiner, N. Radukina, J. Eisfeld, F. Kuhn, A. Luckhoff, Regulation of TRPM2 channels in neutrophil granulocytes by ADP-ribose: a promising pharmacological target, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 371 (2005) 325–333.
 - [86] H.S. Park, C. Hong, B.J. Kim, I. So, The pathophysiological roles of TRPM7 channel, *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 18 (2014) 15–23.
 - [87] S.H. Donaldson, E.G. Poligone, M.J. Stutts, CFTR regulation of ENaC, *Methods Mol. Med.* 70 (2002) 343–364.
 - [88] M. Mall, M. Bleich, R. Greger, R. Schreiber, K. Kunzelmann, The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways, *J. Clin. Invest.* 102 (1998) 15–21.

- [89] M. Mall, B.R. Grubb, J.R. Harkema, W.K. O'Neal, R.C. Boucher, Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice, *Nat. Med.* 10 (2004) 487–493.
- [90] K. Kunzelmann, M. Mall, M. Briel, et al., The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator attenuates the endogenous Ca²⁺ activated Cl⁻ conductance of *Xenopus* oocytes, *Pflügers Arch.* 435 (1997) 178–181.
- [91] J. Ousingsawat, P. Kongsuphol, R. Schreiber, K. Kunzelmann, CFTR and TMEM16A are separate but functionally related Cl⁻ channels, *Cell. Physiol. Biochem.* 28 (2011) 715–724.
- [92] M. Lu, Q. Leng, M.E. Egan, et al., CFTR is required for PKA-regulated ATP sensitivity of Kir1.1 potassium channels in mouse kidney, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 797–807.
- [93] E.M. Schwiebert, M.E. Egan, T.H. Hwang, et al., CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP, *Cell* 81 (1995) 1063–1073.
- [94] R. Planells-Cases, A. Ferrer-Montiel, TRP Channel Trafficking, (2007).
- [95] R. Jahn, T. Lang, T.C. Sudhof, Membrane fusion, *Cell* 112 (2003) 519–533.
- [96] H.Y. Gee, J. Kim, M.G. Lee, Unconventional secretion of transmembrane proteins, *Semin. Cell Dev. Biol.* 83 (2018) 59–66.
- [97] J. Kim, H.Y. Gee, M.G. Lee, Unconventional protein secretion - new insights into the pathogenesis and therapeutic targets of human diseases, *J. Cell. Sci.* 131 (2018).
- [98] X. Hou, K.T. Lewis, Q. Wu, et al., Proteome of the porosome complex in human airway epithelia: interaction with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), *J. Proteomics* 96 (2014) 82–91.
- [99] S.H. Lim, E.A. Legere, J. Snider, I. Stagljar, Recent progress in CFTR interactome mapping and its importance for cystic fibrosis, *Front. Pharmacol.* 8 (2017) 997.

Curriculum vitae



CHLOE GREBERT

FORMATION

Université de Poitiers 2016-2019

Doctorat en physiologie
cellulaire : rôle des
phospholipases C dans la
régulation de la sécrétion
d'ions chlorure et de
l'homéostasie calcique
dans les cellules
épithéliales bronchiques :
intérêt dans la
mucoviscidose

Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 2008-2015

Diplôme de docteur en
pharmacie, thèse
d'exercice sur les biofilms
dans la mucoviscidose

Filière industrie-recherche :
Master : Conception et
production de molécules
d'intérêt thérapeutique

7 rue des Ecosais
86000 Poitiers, France
06 85 71 72 24
chloe.grebert@univ-poitiers.fr

EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

Pharmacien adjoint 2015-2016

Pharmacie du marché, Mulhouse (4 mois)

Pharmacie de Fleur, Vieux Thann (5 mois)

Stage de fin d'études en développement préclinique 2014

Laboratoires Pierre Fabre, Castres (6 mois)

Développement du modèle Caco-2 ; modèle d'absorption et d'efflux des médicaments. Culture cellulaire, mise au point des conditions expérimentales (pH et concentration), calcul de la perméabilité apparente de molécules pour l'établissement de références, comptage à scintillation

Stage hospitalo-universitaire 2013

Laboratoire de bactériologie de l'hôpital, Strasbourg (3 mois)

Vérification / validation d'une méthode de dosage ELISA permettant le diagnostic de la borréliose de Lyme

Service de médecine interne, NHC, Strasbourg (3mois)

Étude de cas cliniques, déclarations au service de pharmacovigilance

Stage d'initiation à la recherche (6 mois) 2012-2013

Laboratoire de biophotonique et pharmacologie, Strasbourg

Étude de la protéine NCp7 du VIH par les méthodes de RISC (Raster Image Correlation Spectroscopy) et FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Culture cellulaire, transfections, préparation d'ADN

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Grebert, C., Becq, F., and Vandebrouck, C. (2019). Focus on TRP channels in cystic fibrosis. *Cell Calcium* 81, 29 – 37. **Article publié**

Grebert, C., Becq, F., and Vandebrouck, C. (2019). Phospholipase C controls chloride-dependent short-circuit current in bronchial epithelial cells. **Article en cours de soumission**

- Mars 2019 - 16th European Cystic Fibrosis Society : "PLCβ3 is involved in forskolin-dependent CFTR activation." **Poster**
- Février 2019 –Colloque Français des jeunes chercheurs – Vaincre la mucoviscidose : "La PLCβ3 joue un rôle dans l'activation forskoline-dépendante du CFTR dans les cellules pulmonaires 16HBE." **Poster**
- Mars 2018 - 56th European Cystic Fibrosis Society : "PLC-δ1 is a new partner of CFTR in pulmonary epithelial cells : role and physiological consequences." **Poster**
- Février 2019 –Colloque Français des jeunes chercheurs – Vaincre la mucoviscidose : "Altération de l'interaction entre la PLCδ1 et le F508del-CFTR dans les cellules épithéliales bronchiques mucoviscidosiques : conséquences sur l'activité du CFTR." **Poster**