THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant
Spécialité : Physiologie-Physiopathogies-Pharmacologie
Unité de recherche : Biologie et Biotechnologie pour la Santé

Caractérisation de la réponse inflammatoire pulmonaire dans la mucoviscidose : Implication du CFTR et PROK1 dans les dysfonctions épithéliales et endothéliales

Pulmonary Inflammation in Cystic Fibrosis: Functional Roles of CFTR and PROK1 in Epithelial and Endothelial Barrier Disruption

Présentée par :

Camille LYKO

Direction de thèse :

Mohamed BENHAROUGA Professeur, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES	Directeur de thèse

Rapporteurs :

Alexandre HINZPETER
CHARGE DE RECHERCHE HDR, INSERM Ile-de-France (Paris 5)
Sophie BROUILLET
PROFESSEURE DES UNIVERSITES - PRATICIENNE HOSPITALIERE, Université de Montpellier

Thèse soutenue publiquement le **3 octobre 2025**, devant le jury composé de :

Frédéric BECQ, PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Poitiers	Président
Mohamed BENHAROUGA, PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes	Directeur de thèse
Alexandre HINZPETER, CHARGE DE RECHERCHE HDR, INSERM Ile-de-France (Paris 5)	Rapporteur
Sophie BROUILLET, PROFESSEURE DES UNIVERSITES - PRATICIENNE HOSPITALIERE, Université de Montpellier	Rapporteure
Emilie BONCOEUR, PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes	Examinatrice
Isabelle MICHAUD-SORET, DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes	Examinatrice

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au professeur Frédéric Becq pour avoir accepté de présider ma soutenance de thèse, et pour m'avoir initiée à la mucoviscidose.
Je remercie également le docteur Alexandre Hinzpeter et la docteure Sophie Brouillet pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de ce manuscrit.
Mes remerciements vont aussi au docteur Émilie Boncoeur et à la docteure Isabelle Michaud-Soret pour leur présence au sein de mon jury en tant qu'examinatrices.
Je remercie également le docteur Nicolas Ricard pour avoir suivi mon parcours doctoral en tant que membre de mon comité de suivi individuel. Votre bienveillance à mon égard m'a aidée à mener ce projet jusqu'au bout.

Merci à Catherine Picard de m'avoir accueillie au sein de BCI.

Je remercie tout particulièrement le professeur Mohamed Benharouga pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ce projet. Cette confiance a été essentielle à mon épanouissement. J'ai énormément appris et mûri au fil de cette aventure doctorale, et je sais que cela tient en grande partie à tes conseils avisés et à la liberté que tu m'as laissée. Je te suis également reconnaissante pour ton enthousiasme constant et la richesse de tes partages scientifiques. J'ai hâte de découvrir les résultats des projets à venir, et je te souhaite le meilleur pour la suite.

Enfin, un grand merci au Dr.Nadia Alfaidy pour m'avoir accueillie dans son équipe, pour son attention constante, son soutien scientifique et sa bienveillance tout au long de cette thèse. Merci à toute l'équipe MAB2 : Christel, Carine, Salomé, Morgane, Mélanie, Fred et Nico Lemaitre, pour votre accueil, votre collaboration et votre soutien tout au long de cette thèse. Merci également aux membres de passage, que ce soit pour quelques mois ou un peu plus : Caroline, Ioanna, Tristan, Jeanne, Fériel, Kevin, Constance, Martial, Alizée, Margaux… et tous les autres avec qui j'ai eu plaisir à partager un bout de cette aventure.

À toutes les personnes du labo : un immense merci. Merci de faire vivre ce bâtiment, de l'habiter de vos sourires dans les couloirs, de vos discussions volées entre deux portes, de votre énergie collective. Vous êtes celles et ceux qui ont rendu cette aventure bien plus agréable. J'ai adoré partager avec vous les soirées jeux, les mardis gâteau, les repas de Noël… autant de parenthèses qui ont fait toute la différence.

Merci aussi à celles qui ont été mes stagiaires au fil des années :
À Mélanie, de stagiaire à collègue, puis amie et coloc de bureau. Merci pour tous ces moments partagés : les projets, les débats enflammés, les bons plans et les potins. Tu as suivi cette thèse

jusqu'au bout, et même depuis Swansea, tu restes une pièce essentielle de cette aventure. Nos discussions me manquent déjà.

À Joëlle, la fausse calme, merci d'avoir participé à ce projet avec ton sérieux… et ta malice. Je te souhaite une thèse pleine de fun et de découvertes.

À Jana et Christy, merci pour votre implication, votre curiosité et votre énergie. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

À Morgane, partenaire de bureau, de thé et de galères : merci pour ta patience, ton écoute, et tous ces moments partagés qui ont rendu le quotidien de la thèse bien plus doux.

À Estelle, merci pour ton amitié, ta sensibilité et nos échanges qui continuent bien au-delà du labo. Même si nos chemins professionnels se sont séparés, nos discussions autour des livres, de la musique et du reste restent toujours un plaisir.

À Bea, camarade de promo et partenaire de pause-café, de déjeuners, de potins et de bons livres. Merci pour ta présence constante, ton sens de l'organisation redoutable et ta capacité à rendre le quotidien de la thèse plus léger. Ce fut un plaisir de partager cette aventure avec toi.

À Nico Lemaitre, pour ton soutien technique, ton aide morale, et ta capacité à sauver les manips sans jamais perdre ton calme. Merci pour ta bonne humeur, tes conseils avisés… et ta tolérance face aux playlists concoctées par Estelle, Nico et moi.

À Nico Chaummontel, merci pour ta bonne humeur contagieuse, nos discussions toujours sincères, et tes propositions musicales (avec Estelle) qui ont été bien plus qu'une simple playlist : la bande-son de ces années de thèse.

À Fred, merci pour ton humour, ton calme à toute épreuve, et ta capacité à répondre à toutes mes questions, même (et surtout) quand elles étaient nombreuses.

Au bureau BRM & Co, merci pour votre bonne humeur collective, les discussions toujours sympas… et les biscuits de Nathan ! Une pensée particulière pour Caroline, en pause labo pour une autre belle aventure, mais qui a toujours su trouver les mots justes au bon moment. Et merci à l'haltérophile d'avoir pris soin de mes cellules pendant la rédaction et de m'avoir régulièrement rappelé de survivre à cette dernière ligne droite.

Merci aux filles de BAL pour les petites discussions qui font du bien, les dépannages de dernière minute et vos conseils toujours au top en matière de style. Un grand merci aussi à nos gestionnaires, Isabelle, Christine et Axelle, pour votre bienveillance, votre disponibilité et toute l'aide précieuse que vous m'avez apportée.

À Ninine, Noréo (et la petite Sophie), Emilie et Marie : merci pour les sorties romanaises, votre amitié indéfectible, et toutes ces anecdotes qui s'accumulent depuis maintenant 17 ans. Vous faites partie de ce fil précieux qui m'accompagne, quoi qu'il arrive.

Merci à mes parents, pour tout, même les petits riens. Merci pour les longues discussions du soir, les thés chauds du matin, les sorties ski, les balades avec le chien, les bons petits plats et les brunchs du dimanche. Merci d'être là, de m'avoir soutenue et souvent sortie la tête de la thèse.

À mon petit frère, merci pour tes messages, tes photos, et ce koala qui veille sur moi. Merci de me faire relativiser quand il le faut. Je suis fière de toi.

Et à toi, mon plus connu des inconnus.

Merci d'avoir marché une heure et demie avec moi à une heure du matin. Merci de m'avoir soutenue depuis le début, d'avoir cru en moi quand j'oubliais d'y croire. Tu es ce rayon de soleil dans les nuages que sont parfois mes pensées. Merci de m'avoir supportée pendant cette thèse, qui, soyons honnêtes, ne m'a pas toujours rendue facile à vivre. Merci pour ton écoute, tes conseils, ton humour. Merci pour les soirées, les bons petits plats, les films parfaits après des journées trop longues. Merci pour ton sourire.

Table des matières

Liste des figures 11

Liste des tableaux 12

Liste des abréviations 13

Avant-Propos 15

Chapitre 1 : L'inflammation 19

Définition et rôle physiopathologique de l'inflammation 19

1. Typologie de l'inflammation 19

2. Les différentes étapes de la réponse inflammatoire : 20

3. Les mécanismes cellulaires de l'inflammation 23

4. Les cytokines : messagers moléculaires de l'inflammation 31

5. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) 33

6. Exacerbation de la réponse inflammatoire 33

7. Le rôle de l'angiogenèse dans l'inflammation persistante 35

Chapitre 2 : Angiogenèse et cellules endothéliales 36

Partie 1 : L'angiogenèse 36

1. Définition de l'angiogenèse 36

2. Étapes du processus angiogénique 37

a. Activation des cellules endothéliales 37

b. Dégradation de la matrice extracellulaire 38

c. Prolifération des cellules endothéliales 38

d. Migration cellulaire 38

e. Formation du tube vasculaire 38

f. Maturation et stabilisation 38

3. Régulation moléculaire de l'angiogenèse 39

4. Régulation cellulaire 41

5. L'angiogenèse dans les pathologies humaines 41

6. Conclusion de la Partie 1 41
Partie 2 : Le tissu endothélial 42
1. Définition 42
2. Structure histologique des vaisseaux 42
a. Les artères : 42
b. Les veines : 43
3. Les cellules endothéliales macrovasculaires et microvasculaires : différences, fonctions et spécificités 43
a. Introduction générale 43
b. *Cellules endothéliales macrovasculaires (CEMA) : Fonctionnement et spécificités* 44
c. Cellules endothéliales microvasculaires (CEMi) : fonctionnement et spécificités.. 45
e. Synthèse des différences entre les cellules endothéliales microvasculaires (CEMA) et microvasculaires (CEMi), fonctionnement et complémentarités 47
f. Approches expérimentales et implications translationnelles 47
48
d. Focus sur les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires (CEPM)..... 49
4. Perméabilité et résistance électrique 50
5. Signalisation intracellulaire 51
6. Transmigration leucocytaire 53
7. Maturation vasculaire 55
8. Plasticité phénotypique 57
a. Réponse au flux sanguin (shear stress) 57
b. Adaptation à l'hypoxie 58
c. Activation inflammatoire 58
d. Transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT) : 58
e. Influence du microenvironnement : 58
9. Endothélium et pathologies 59

Chapitre 3 : Les prokinéticines 62
1. Découverte de la famille des prokinéticines 62
2. Identification des prokinéticines humaines 63
3. Découverte des récepteurs : PROKR1 et PROKR2 64
3.1. Voie de signalisation dépendante des protéines G 65
3.3. Rôle des RCPG dans les pathologies pulmonaires 68
3.4. Nomenclature standardisée pour les prokinéticines 70
4.Structure et activation des prokinéticines 70
Récepteurs PROKR1 et PROKR2 70
4.1 Signalisation intracellulaire activée 71
4.2 Inhibiteurs des prokinéticines 72
4.3 Rôle des prokinéticines dans l'inflammation 74
4.4 Prokinéticines et angiogenèse 75
4.5 Prokinéticines et pathologies pulmonaires 76
Chapitre 4 : Le système respiratoire et la mucoviscidose 78
Partie 1 : Le système respiratoire 78
Introduction 78
Organisation générale du système respiratoire 78
Structure histologique de l'arbre trachéo-bronchique 79
Les cellules de l'épithélium trachéo-bronchique 80
Les cellules de l'épithélium bronchiolaire 81
Les cellules de l'épithélium alvéolaire 82
Les jonctions intercellulaires 83
La clairance mucociliaire 85
Partie 2 : La mucoviscidose 88
1.Généralités 88
2. Du gène à la protéine CFTR 90

A. Le gène CFTR 90
B. Structure protéique de CFTR 92
3. Fonction de CFTR 94
A. CFTR en tant que canal chlorure 94
B. CFTR comme régulateur d'autres canaux ioniques 95
C. Régulation du canal ORCC 95
D. Régulation du canal ENaC 95
E. Régulation d'autres canaux et rôles extra-pulmonaires 95
F. *Rôle dans les jonctions cellulaires* 95
G. Rôle dans l'infection et l'inflammation 96
4. Mutations du gène CFTR 98
Classification fonctionnelle des mutations CFTR 98
Thérapies ciblant CFTR 106
Correcteurs de CFTR et doubles combinaisons 108
Effets extrapulmonaires des modulateurs 108
Données en vie réelle et limites 109
Article 1 118
Introduction 118
Discussion 150
Conclusion et perspectives 153
Article 2 154
Introduction 154
Discussion 207
Conclusions et perspectives 209
Discussion générale 212
Conclusions générales 215
Perspectives 219

I. Approfondissement des modèles cellulaires épithéliaux et endothéliaux pulmonaires 219
A. Étude des effets de PROK1 et PROK2 sur l'intégrité des barrières 219
B. Rôle du milieu de culture sur la réponse endothéliale 219
C. Étude de l'expression et de la localisation des protéines jonctionnelles 220
II. Développement d'un modèle endothélial CFTR-dF508 220
A. Génération et validation du modèle 220
B. Étude de la réponse inflammatoire et de la sensibilité aux prokinéticines 221
C. Rôle de CFTR dans l'établissement et le maintien de la barrière 221
D. Effet des correcteurs de CFTR 221
III. Modélisation de l'interaction épithélium–endothélium 221
A. Co-cultures HBE–HPMEC 221
B. Co-cultures CFBE–HPMEC-dF508 222
C. Étude de la transmigration leucocytaire à travers les bicouches 222
IV. Rôle fonctionnel de CFTR dans la régulation des barrières pulmonaires 222
A. Étude des interactions CFTR–PROK1 222
B. Implication de CFTR dans l'adhésion et la transmigration leucocytaire 222
V. Influence de la maturation cellulaire sur la sensibilité à PROK1/2 223
VI. Régulation de la sécrétion de prokinéticines par l'épithélium bronchique 223
VII. Cartographie des voies de signalisation activées par PROK1/2 223
Références 225
Production scientifique 268
Publication 268
Participation aux congrès 268

Liste des figures

Figure 1 : Lésion cellulaire et infection ; Activation immunitaire via les *PRRs. (Dubois, 2019)* 21

Figure 2: Les étapes de la réponse inflammatoire aiguë. 23

Figure 3 Activation, adhésion et transmigration des neutrophiles. *(source:https://www.cours-pharmacie.com/immunologie/limmunite-innee.html)* 25

Figure 4 : Diagramme de granulopoïèse *(Source : https://www.espacesoignant.com/soignant/anatomie-physiologie/physiologie-hematopoiese)* 27

Figure 5: Schéma des mécanismes d'actions des neutrophiles *(source :(George et al., 2021))*.....29

Figure 6 Schéma illustrant le processus de bourgeonnement angiogénique *(Source : Mahdi Ahmadi & Jafar Rezaie 2020) :*.....39

Figure 7 Signalisation VEGF/VEGFR-2 → PI3K/AKT / MAPK (*Source : Kong et al.,2023)*.....40

Figure 8: Architecture de la paroi artérielle et veineuse *(source Billoir, 2020)****.***.....43

Figure 9 Hétérogénéité des cellules endothéliales *(source : Aird, 2012)*.....44

Figure 10 Voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR dans la régulation cellulaire endothéliale. *(Source Therkildsen et al., 2014)*.....51

Figure 11: Régulation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine en absence (a) ou en présence (b) de ligand. *(Source:Maurice & Angers,2025)*.....52

Figure 12: La voie NF-κB *(Guo et al,. 2024)* 53

Figure 13: Cascade d'adhésion et d'extravasation leucocytaire *(Souce :Zonneveld et al., 2014)*.....55

Figure 14: Rôle des angiopoïétines et du récepteur Tie2 dans la stabilité vasculaire. *(Moritz et al.,2017)*.....57

Figure 15 Architecture de l'endothélium vasculaire sain et dysfonctionnel *(source : Bernard et al.2020).*.....61

Figure 16 Représentation simplifiée de la structure des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG*). (Source : Schneider et al., 2018).* 65

Figure 17 Voie de signalisation intracellulaire déclenchée par la liaison PROK/PROKR *(Source : Vincenzi et al., 2023)* 68

Figure 18 Représentation schématique des systèmes prokinéticines. *(Source : Vincenzi et al., 2023****)*** *71*

Figure 19 Structures chimiques des antagonistes PC1 et PKR-A, ainsi que de l'agoniste IS20.....73

Figure 20 Schéma de la transition cellulaire et tissulaire de l'arbre respiratoire depuis la trachée/bronches jusqu'aux alvéoles. *(Source: Ganong's Review of Medical Physiology, 25th Ed., Barrett K.E. et al., 2015.)*.....80

Figure 21 Organisation des principales jonctions intercellulaires dans un épithélium polarisé. 85

Figure 22 Évolution du nombre de patients atteints de mucoviscidose en France de 1992 à 2023 *(Source : Registre français de la mucoviscidose, 2023.)*.....88

Figure 23 Données épidémiologiques de la mucoviscidose en France *(2013–2023) Source : Registre français de la mucoviscidose, Rapport 2023*.....89

Figure 24 Organisation structurale de la protéine CFTR *(Source : Farinha & Canato.,2017 ; Serohijos et al.,2008)*.....93
Figure 25 Représentation des six classes fonctionnelles de mutations du gène CFTR. *(Source : Férec.,2021)* 100
Figure 26 Altération de la fonction de CFTR dans l'épithélium bronchique chez les patients atteints de mucoviscidose 103
Figure 27 Dysfonction vasculaire pulmonaire induite par l'inflammation chronique.....105
Figure 28 Altération conformationnelle de CFTR et impact de PROK1 : deux axes complémentaires dans la dérégulation inflammatoire pulmonaire au cours de la mucoviscidose 114
Figure 29 Les différents axes abordés au cours de ma thèse.....115
Figure 30: Restauration de CFTR et modulation de la réponse inflammatoire dans la mucoviscidose. *(Source : Liu et al., 2019; Zhang et al., 2018)* 152
Figure 31 : Maturation des HPMEC et modulation de la réponse inflammatoire selon le stade de différenciation.....209
Figure 32 Impact différencié des stratégies de correction de CFTR sur l'inflammation et la barrière épithélio-endothéliale dans la mucoviscidose.....216

Liste des tableaux

Tableau 1 Principaux facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques impliqués dans la régulation vasculaire.....40
Tableau 2 Comparaison entre cellules endothéliales macrovasculaires (CEMA) et microvasculaires (CEMi).....48
Tableau 3 Endothélium sain vs endothélium dysfonctionnel 60
Tableau 4 Profil des mutations CFTR les plus courantes *(Source Moskowitz et al.,2008)*.....98

Liste des abréviations

ABC : ATP-Binding Cassette

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

ARRB : Arrestine

Bv8 : Peptide de la peau du crapaud *Bombina variegata*

CF : Cystic Fibrosis (Mucoviscidose)

CFBE : Cellules bronchiques épithéliales exprimant CFTR

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

CFTRinh-172 : Inhibiteur spécifique de CFTR

DAG : Diacylglycérol

EG-VEGF : Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor

ENaC: Epithelial Sodium Channel

GDP : Guanosine Diphosphate

GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor

GRK : G protein-coupled Receptor Kinase

GTP : Guanosine Triphosphate

GTPγS : Analogue non hydrolysable du GTP

HBE : Human Bronchial Epithelial cells

HPMEC : Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells

ICAM : Intercellular Adhesion Molecule

IL : Interleukine

IP3 : Inositol 1,4,5-triphosphate

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MIT-1 : Mamba Intestinal Toxin 1

MSD: Membrane-Spanning Domain

Na^+ : Ion sodium

NETs: Neutrophil Extracellular Traps

NBD : Nucleotide Binding Domain

ORCC : Outwardly Rectifying Chloride Channel

P2R : Récepteur purinergique

PDZ : Domaine protéique d'ancrage

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PROK1 / PROK2 : Prokinéticine 1 / 2

PROKR1 / PROKR2 : Récepteurs de PROK1 / PROK2

RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G

RD : Domaine Régulateur

SLC26A6 : Échangeur anionique Cl^-/HCO_3^-

TEER : TransEndothelial Electrical Resistance

TNF-α : Tumor Necrosis Factor alpha

TM : TransMembranaire

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VPRA : Venom Protein of *Dendroaspis polylepis*

ZO-1 : Zonula Occludens-1

Avant-Propos

L’inflammation est une réponse physiologique complexe, essentielle à la défense de l’organisme contre les infections et les agressions tissulaires. Elle implique un large réseau de signaux cellulaires et moléculaires visant à éliminer les agents pathogènes, réparer les tissus endommagés et restaurer l’homéostasie. Toutefois, lorsque cette réponse devient excessive, chronique ou mal régulée, elle peut contribuer à la progression de nombreuses maladies, notamment dans le poumon, où l'équilibre entre défense immunitaire et intégrité tissulaire est particulièrement important.

Dans les poumons, l’inflammation se manifeste principalement au niveau de deux interfaces clés : l’épithélium bronchique et l’endothélium microvasculaire. L’épithélium, en contact direct avec l’air inspiré, constitue la première barrière contre les agents pathogènes, tandis que l’endothélium forme une barrière fine mais essentielle entre le compartiment vasculaire et les tissus pulmonaires. Ces deux couches cellulaires interagissent étroitement pour maintenir l’intégrité pulmonaire et réguler les échanges de fluides, de cellules immunitaires et de médiateurs de l’inflammation. Toute perturbation de cette coopération, qu’elle soit génétique, infectieuse ou inflammatoire, peut provoquer une altération des fonctions barrières, une fuite vasculaire, une accumulation de mucus et une infiltration leucocytaire, contribuant à la progression des pathologies respiratoires chroniques. Dans ce contexte, comprendre comment l’inflammation affecte, et est affectée, par, l’activité de ces deux compartiments cellulaires est essentielle pour mieux cibler les mécanismes pathogéniques.

Dans l’épithélium, une protéine joue un rôle particulièrement critique : CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), un canal ionique régulant le transport du chlorure et du bicarbonate. Les mutations du gène CFTR, notamment F508del, altèrent sa maturation et son trafic intracellulaire, menant à la mucoviscidose, une maladie caractérisée par l’accumulation de mucus, des infections chroniques, et une inflammation pulmonaire persistante. Si des correcteurs et potentialisateurs de CFTR ont récemment vu le jour, leur impact sur la réponse inflammatoire associée à la mucoviscidose reste partiel, suggérant un rôle additionnel du CFTR au-delà du simple transport ionique, probablement lié à sa conformation tridimensionnelle et à ses interactions avec d’autres protéines de signalisation.

Parallèlement, dans l’endothélium pulmonaire, des facteurs émergents comme les prokinéticines (notamment PROK1) sont apparus comme des régulateurs majeurs de la réponse inflammatoire. Les membres de cette famille, y compris PROK1, sont impliqués dans la mucoviscidose au niveau de l’épithélium pulmonaire.

PROK1 agit via deux récepteurs couplés aux protéines G (PROKR1 et PROKR2), exprimés à la fois dans les cellules endothéliales, épithéliales et immunitaires. Initialement identifiée pour ses effets angiogéniques, PROK1 est aujourd'hui reconnu pour sa capacité à moduler la signalisation inflammatoire, et l'intégrité de la barrière endothéliale dans des contextes pathologiques variés, incluant la mucoviscidose. Dans ce contexte, nos travaux ont visé à caractériser les mécanismes inflammatoires et angiogéniques dans les compartiments épithélial et endothélial pulmonaires, en explorant spécifiquement deux axes complémentaires :

- Dans l'épithélium bronchique, nous avons étudié l'effet des modulateurs pharmacologiques du CFTR sur la fonction de barrière et la réponse inflammatoire dans des modèles cellulaires de mucoviscidose, incluant des cellules bronchiques saines (HBE), des cellules CF (CFBE), et des cellules CF corrigées par CFTR de type sauvage (CFBE-wt).
- Dans l'endothélium microvasculaire pulmonaire, nous avons évalué l'impact de la prokinéticine-1 (PROK1) sur la perméabilité vasculaire, la production de cytokines, la réorganisation du cytosquelette et l'interaction avec les cellules immunitaires, en utilisant des cellules HPMECs à différents stades de leur maturation.

Nos résultats montrent que dans l'épithélium bronchique, la restauration complète de la conformation native du CFTR par surexpression (CFBE-wt) réduit significativement la réponse inflammatoire, contrairement aux modulateurs seuls, qui, bien qu'ils rétablissent partiellement la sécrétion de Cl^-, n'atteignent pas le même niveau de réduction de l'inflammation. Ces données suggèrent que le repliement tridimensionnel complet de CFTR est nécessaire pour son rôle régulateur des processus inflammatoires associés à la mucoviscidose.

Dans l'endothélium pulmonaire, nous avons observé que, en fonction de son état de maturation, l'exposition à PROK1 peut entraîner la désorganisation des jonctions intercellulaires, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la production accrue de cytokines pro-inflammatoires, l'activation des cellules immunitaires et leur transmigration à travers le tapis endothélial. Ces résultats, illustrent le rôle biphasique (modulateur et activateur) potentiel de PROK1 dans la régulation endothéliale en contexte inflammatoire ou infectieux.

Ces deux travaux mettent en lumière la complexité de la régulation de l'inflammation pulmonaire, qui ne dépend pas uniquement de l'activité fonctionnelle des protéines CFTR ou PROK1, mais aussi de l'intégrité structurale du lit microvasculaire au moment de la réponse inflammatoire et de l'interactions de ces protagonistes contextuelles avec d'autres acteurs de la cellule.

L’épithélium et l’endothélium interagissent de façon dynamique dans la genèse et la résolution de l’inflammation, et nos résultats appellent à une approche intégrative pour cibler efficacement les processus pathologiques pulmonaires, comme la mucoviscidose.

À l’avenir, l’identification des partenaires protéiques de CFTR impliqués dans la signalisation inflammatoire, ainsi que le développement de modulateurs de structure plus précis, pourraient ouvrir la voie à des traitements plus efficaces. Par ailleurs, les prokinéticines, encore peu explorés dans ce contexte, pourraient représenter une nouvelle cible thérapeutique pour limiter la perméabilité vasculaire et les désordres inflammatoires dans les maladies pulmonaires chroniques.

Introduction

Chapitre 1 : L'inflammation

Définition et rôle physiopathologique de l'inflammation

L'inflammation est une réaction biologique essentielle, universelle et conservée chez tous les organismes pluricellulaires possédant un système immunitaire. Elle correspond à la réponse de l'organisme face à une agression ou une lésion affectant les tissus vascularisés. Cette réaction vise à reconnaître, neutraliser et éliminer les agents pathogènes ou les cellules lésées, tout en initiant un processus de réparation tissulaire (Liehn & Cabrera-Fuentes, 2015).

La réaction inflammatoire est à la fois protectrice et réparatrice : d'une part, elle empêche la propagation de l'infection ou de la lésion en mobilisant les défenses immunitaires; d'autre part, elle favorise le retour à un état fonctionnel normal du tissu atteint (Liehn & Cabrera-Fuentes, 2015). Cependant, une inflammation mal contrôlée peut devenir délétère. En effet, une inflammation prolongée ou excessive peut conduire à une destruction tissulaire irréversible, favorisant le développement de maladies chroniques comme la fibrose pulmonaire, la mucoviscidose, ou des maladies auto-immunes (Medzhitov, 2008).

L'inflammation peut être déclenchée par différents types d'agents ou de stimuli, classés selon leur nature :

- **Physiques :** blessures mécaniques, brûlures thermiques, gelures ou irradiation (L. Chen et al., 2018).
- **Chimiques :** toxines, venins ou substances irritantes (Nathan, 2002).
- **Infectieux :** agents microbiens comme des bactéries, virus, champignons, parasites (Janeway, 2001).
- **Immunologiques :** dérèglements du système immunitaire, notamment dans les allergies ou maladies auto-immunes (Chaplin, 2010).

L'intensité et la nature de la réponse inflammatoire dépendent de l'état immunitaire de l'hôte, qui repose sur un équilibre subtil entre facteurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Cet équilibre assure la mise en place d'une réponse efficace, puis sa résolution pour éviter l'installation d'une inflammation chronique.

1. Typologie de l'inflammation

L'inflammation peut se présenter sous deux formes principales : l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique. Ces deux formes diffèrent par leur durée, leurs mécanismes cellulaires, et leurs conséquences.

1.1 Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est une réponse rapide et transitoire qui apparaît généralement dans les minutes à quelques jours suivant l'agression.

Elle est localisée au niveau de la zone lésée et se caractérise par les cinq signes cardinaux classiques : **rougeur**, **chaleur**, **gonflement**, **douleur**, et parfois **perte de fonction** (Celsus, Ier siècle).

Cette réaction résulte principalement de la libération par les cellules immunitaires résidentes du tissu agressé de médiateurs chimiques tels que les cytokines, les prostaglandines, l'histamine, et les protéases (Alves et al., 2017; Cho et al., 2016). Ces molécules induisent la vasodilatation locale, augmentent la perméabilité vasculaire, et facilitent le recrutement des cellules immunitaires circulantes vers le site d'inflammation.

L'objectif principal de l'inflammation aiguë est d'éliminer rapidement l'agent pathogène ou la source de dommage, puis d'initier la réparation tissulaire.

1.2 Inflammation chronique

Lorsque la phase aiguë échoue à éliminer totalement l'agent agressif ou que la stimulation inflammatoire persiste, une inflammation chronique peut s'installer. Cette forme d'inflammation est caractérisée par une infiltration prolongée de cellules immunitaires, notamment des macrophages, des lymphocytes, et parfois des plasmocytes.

Elle se traduit par une néoformation vasculaire (angiogenèse), une fibrose progressive, et souvent une destruction tissulaire irréversible (Berger, 2000; Cavaillès et al., 2008). Cette situation est typique de nombreuses maladies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), ou la mucoviscidose.

2. Les différentes étapes de la réponse inflammatoire :

La réponse inflammatoire est un processus biologique complexe qui vise à éliminer l'agent pathogène, réparer les tissus lésés et restaurer l'homéostasie. Les principaux mécanismes de la réponse inflammatoire sont :

2.1. Détection de l'agression (reconnaissance de l'agent)

Les cellules sentinelles (macrophages, cellules dendritiques, mastocytes) détectent les agents pathogènes ou les dommages cellulaires grâce à des récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptors), qui reconnaissent (**Figure 1**) :

- Les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns)
- Les DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns)

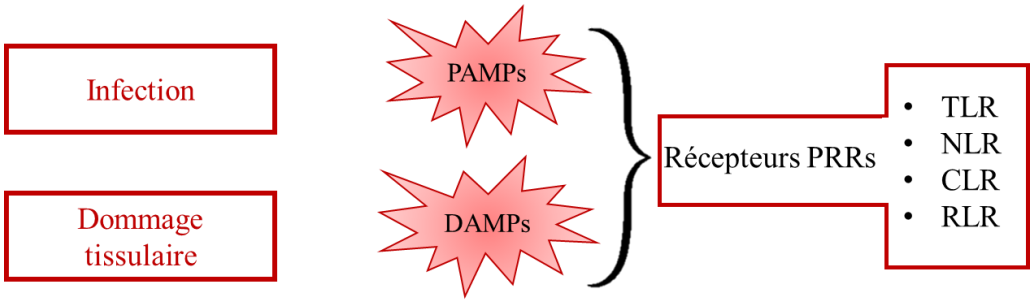


***Figure 1 : Lésion cellulaire et infection ; Activation immunitaire via les** PRRs. (Dubois, 2019)*
Les infections ou les lésions tissulaires entraînent la libération de PAMPs et de DAMPs, qui activent la réponse immunitaire innée via les récepteurs de reconnaissance de motifs (PRRs), dont les TLRs (Toll-Like Receptor), NLR (NOD-Like Receptors), et CLR (C-type Lectin Receptors), RLR (RIG-I-Like Receptor).

2.2. Libération de médiateurs de l'inflammation

Une fois activées, les cellules sentinelles libèrent rapidement des médiateurs chimiques :

- **Histamines (par les mastocytes) :** induisent une vasodilatation, et une augmentation de la perméabilité vasculaire.
- **Cytokines (ex : IL-1, TNF-α, IL-6) :** activent et recrutent d'autres cellules immunitaires.
- **Prostaglandines et leucotriènes :** amplifient la réponse inflammatoire et causent des douleurs et de la fièvre.
- **Chimiokines** : attirent les cellules immunitaires vers le site de l'infection.

2.3. Modifications vasculaires

- **Vasodilatation :** afflux de sang (rougeur, chaleur).
- **Augmentation de la perméabilité vasculaire** : sortie de plasma et de protéines vers les tissus (œdème).
- Expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales : facilite la migration des leucocytes.

2.4. Recrutement des leucocytes

Le recrutement leucocytaire débute par une série d'étapes coordonnées : margination, adhésion, diapédèse, puis chimiotaxie vers le foyer inflammatoire (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Ces mécanismes seront détaillés plus loin dans la section consacrée au recrutement de cellules immunitaires (Voir 3.3).

2.5. Élimination de l'agent pathogène

Ce processus implique plusieurs étapes :

- La phagocytose : les neutrophiles et macrophages ingèrent et détruisent les agents pathogènes.
- La libération d'enzymes et de radicaux libres pour tuer les pathogènes.
- L'activation du complément pour opsoniser, lyser les microbes, et renforcer la réponse.

2.6. Résolution et réparation

Si l'agent est éliminé, des mécanismes anti-inflammatoires prennent le relais :

- Cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF-β)
- Arrêt du recrutement cellulaire
- Réparation des tissus par les fibroblastes, activation de l'angiogenèse et remodelage matriciel

L'ensemble de ces étapes constitue le socle physiopathologique central de la réponse inflammatoire aiguë et chronique et dont les mécanismes cellulaires et moléculaires sont repris dans les paragraphes suivants.

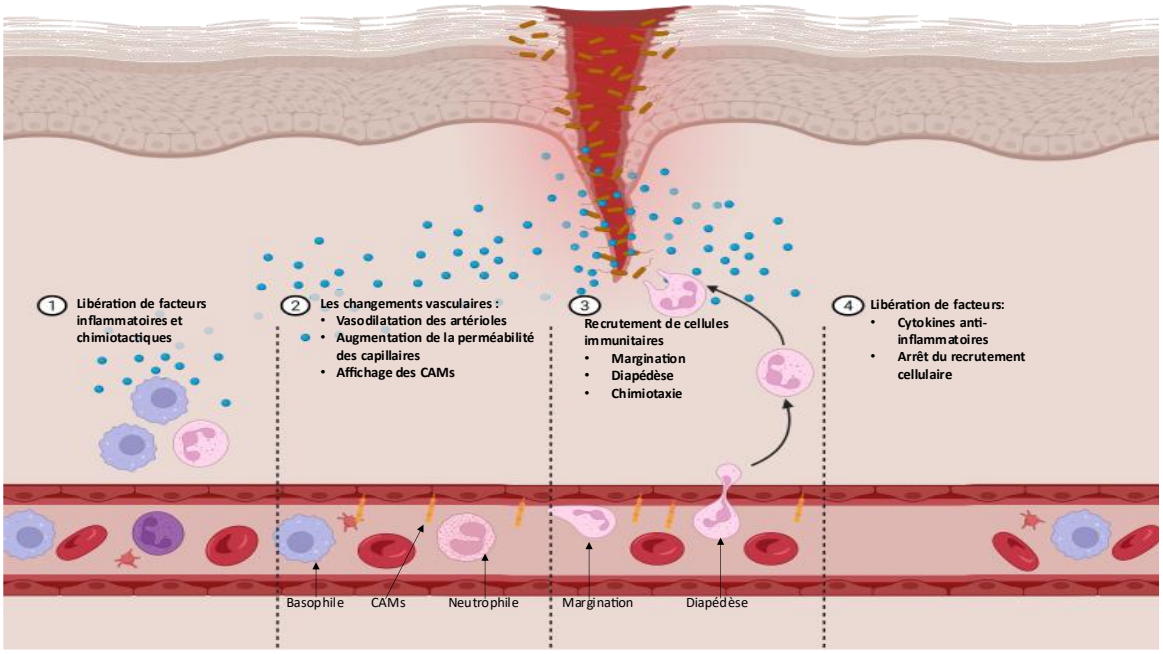


Figure 2: Les étapes de la réponse inflammatoire aiguë.
Cette figure illustre les 4 étapes clés de l'inflammation aiguë après une lésion. ***1. Signal d'alerte :*** *Libération de substances inflammatoires par les cellules lésées.* ***2. Ouverture des vaisseaux :*** *Dilatation et perméabilité augmentée pour faciliter l'arrivée des défenses.* ***3. Arrivée des globules blancs :*** *Les cellules immunitaires sortent du sang et se dirigent vers la zone blessée.* ***4. Résolution :*** *Arrêt de l'inflammation et début de la réparation.*

3. Les mécanismes cellulaires de l'inflammation

3.1 Cellules résidentes

Les cellules résidentes des tissus jouent un rôle fondamental dans la détection initiale de l'agression et dans le déclenchement de la réponse inflammatoire. Ces cellules, qui sont déjà présentes dans les tissus avant toute agression, ont la capacité de reconnaître des signaux de danger et de produire rapidement des médiateurs pro-inflammatoires (St John & Abraham, 2013).

Principales cellules résidentes impliquées :

- **Macrophages tissulaires** : Ces cellules dérivent des monocytes sanguins qui ont migré dans les tissus puis se sont différenciés. Chaque tissu possède ses macrophages spécialisés, comme les Kupffer dans le foie, les microglies dans le cerveau, ou les histiocytes dans les tissus conjonctifs. Ces macrophages reconnaissent les signaux de danger via des récepteurs spécifiques (comme les Toll-like receptors ou les récepteurs scavenger), capables de détecter des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou aux lésions cellulaires (PAMPs/DAMPs, déjà présentés précédemment) (Janeway, 2001).

- **Cellules dendritiques** : Elles sont essentielles pour le lien entre l'immunité innée et adaptative. Ces cellules résidentes détectent les signaux d'agression, capturent les antigènes, puis migrent vers les ganglions lymphatiques pour présenter ces antigènes aux lymphocytes T, déclenchant ainsi une réponse immunitaire spécifique. Elles sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires, amplifiant la réaction locale (Banchereau & Steinman, 1998).
- **Mastocytes** : Présents surtout dans la peau, les muqueuses, et autour des vaisseaux sanguins, les mastocytes contiennent des granules riches en histamine, protéases, cytokines et autres médiateurs. Lorsqu'ils sont activés par des stimuli allergiques ou infectieux, ils libèrent rapidement ces substances, provoquant vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire et recrutement d'autres cellules immunitaires (Galli et al., 2008).

3.2. Fonctions clés des cellules résidentes :

1. **Détection des agressions** : grâce à leurs récepteurs, elles détectent rapidement l'entrée d'un agent pathogène ou les signaux de stress cellulaire.
2. **Libération de médiateurs** : elles sécrètent des cytokines (IL-1β, TNF-α, IL-6), des chimiokines, de l'histamine, et des prostaglandines qui modifient localement la microcirculation (vasodilatation, perméabilité augmentée).
3. **Activation du système de complément** : en produisant des molécules qui activent la cascade du complément, elles amplifient la réaction inflammatoire (Ricklin et al., 2010).
4. **Transmission de signaux d'alerte** : elles transmettent les signaux aux cellules circulantes, en particulier aux leucocytes, pour un recrutement ciblé au site de l'inflammation.

3.3 Cellules recrutées

Lorsque l'agression est détectée et les signaux inflammatoires émis, les cellules immunitaires circulantes sont mobilisées. Ces cellules proviennent du sang et doivent traverser la paroi vasculaire pour atteindre le site inflammatoire, un processus complexe et finement régulé.

3.3.1. Étapes clés du recrutement des leucocytes :

1. **Margination** : en temps normal, les leucocytes circulent au centre des vaisseaux sanguins. En début d'inflammation, le flux sanguin ralentit, ce qui favorise leur déplacement vers la périphérie du vaisseau, au contact de l'endothélium (**Figure 3**).
2. **Roulade ou roulement (rolling)** : grâce à l'expression de molécules d'adhésion appelées **sélectines** (E-sélectine et P-sélectine exprimées par les cellules endothéliales), les leucocytes s'attachent faiblement et roulent sur l'endothélium.

3. **Adhésion ferme** : sous l'action de chimiokines (CXCL8, CCL2, etc.), les intégrines exprimées par les leucocytes changent de conformation pour une forte adhésion à leurs ligands (ICAM-1, VCAM-1) présents à la surface des cellules endothéliales.

4. **Diapédèse** : les leucocytes traversent la paroi vasculaire entre les cellules endothéliales, migrent ensuite dans le tissu conjonctif grâce à des mouvements amiboïdes.

5. **Migration guidée** : les leucocytes sont attirés vers le site d'inflammation par des gradients de chimiokines et autres médiateurs (gradients chimiotactiques).

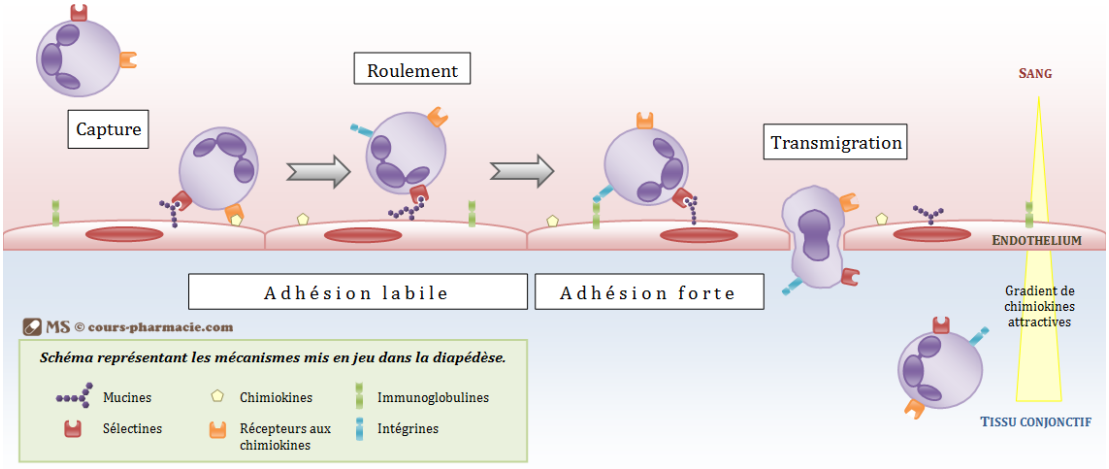


Figure 3 Activation, adhésion et transmigration des neutrophiles. *(source:https://www.cours-pharmacie.com/immunologie/limmunite-innee.html)*
Processus séquentiel montrant le roulement des leucocytes via des sélectines, l'adhésion ferme via les intégrines et ICAM-1/VCAM-1, puis la transmigration (diapédèse)

3.3.2. Cellules majoritairement recrutées :

- **Les neutrophiles** : premières cellules à arriver en masse. Elles jouent un rôle majeur dans la phase aiguë. Leur rôle est détaillé en partie 4.1.2.
- **Les monocytes** : circulant dans le sang, ils migrent dans les tissus où ils se différencient en macrophages ou cellules dendritiques.
- **Les lymphocytes T et B** : interviennent plus tard dans le processus de l'inflammation. Elles assurent une réponse spécifique, notamment dans l'inflammation chronique.

3.3.3. Importance du recrutement :

Le recrutement des cellules immunitaires permet une amplification rapide et ciblée de la réponse inflammatoire. Cette cascade permet d'augmenter la phagocytose, la destruction des agents pathogènes, et la production de médiateurs nécessaires à la résolution de l'inflammation.

Toutefois, un dysfonctionnement dans ce recrutement peut entraîner soit une insuffisance de défense (infection persistante), soit une inflammation excessive ou chronique (maladies auto-immunes).

3.4. Les neutrophiles : acteurs clés de l'inflammation

3.4.1. Introduction

Les neutrophiles, aussi appelés polynucléaires neutrophiles (PNN), sont les leucocytes les plus abondants dans le sang humain, représentant environ 50 à 70 % des globules blancs. Ils constituent la première ligne de défense de l'immunité innée contre les infections, notamment bactériennes et fongiques. Leur mobilisation rapide et leur arsenal microbien puissant leur confèrent un rôle central dans l'inflammation aiguë (L. Chen et al., 2018). Toutefois, leur activation doit être strictement contrôlée, car une réponse excessive ou prolongée peut être délétère pour les tissus de l'hôte. Des altérations fonctionnelles des neutrophiles sont notamment impliquées dans des états pathologiques graves comme le sepsis, où leur dérèglement contribue à l'immunosuppression secondaire et à la survenue d'infections opportunistes (Borregaard, 2010; Demaret, 2016; Demaret et al., 2015).

3.4.2. Origine et caractéristiques des neutrophiles

Les neutrophiles sont issus des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, au cours d'un processus de différenciation appelé granulopoïèse. Sous l'effet de facteurs de croissance comme le G-CSF, les progéniteurs myéloïdes se différencient en myéloblastes, puis en promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes, jusqu'au stade de neutrophiles matures (**Figure 4**).

Ils représentent 50 à 70 % des leucocytes circulants. Leur demi-vie dans le sang est courte (6 à 10 heures), mais elle peut être prolongée dans les tissus en cas de stimulation inflammatoire, sous l'influence de cytokines telles que le GM-CSF (Borregaard, 2010).

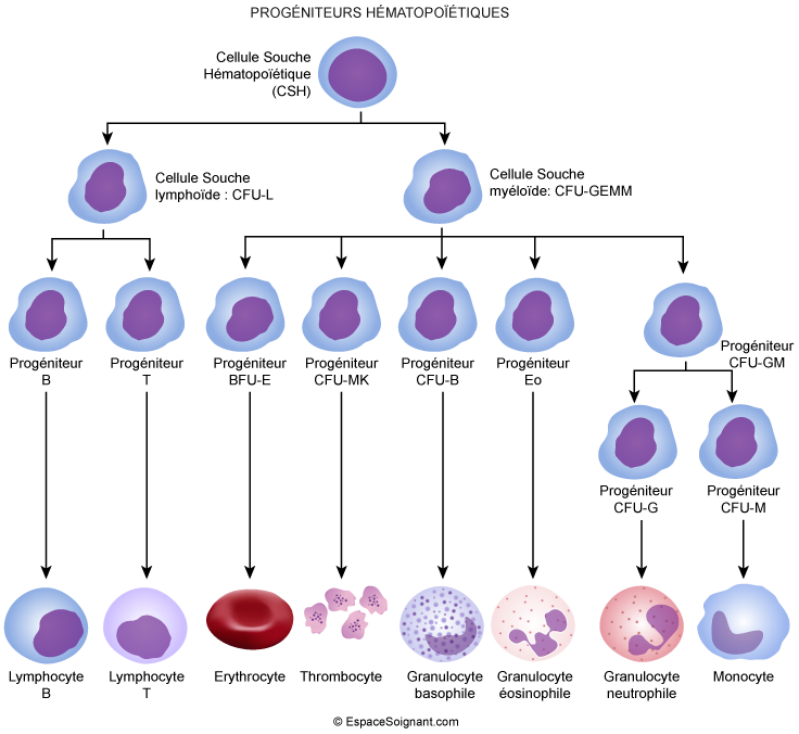


Figure 4 : Diagramme de granulopoïèse *(Source : https://www.espacesoignant.com/soignant/anatomie-physiologie/physiologie-hematopoiese)*
HSC → MPP → GMP → myéloblaste → promyélocyte → myélocyte → métamyélocyte → neutrophile segmenté.

Morphologie :

Les neutrophiles matures possèdent un noyau multilobé (3 à 5 lobes) facilitant leur extravasation dans les tissus. Leur cytoplasme est riche en granules :

- Les granules primaires (azurophiles) contiennent la myélopéroxydase, les défensines, et la cathepsine G.
- Les granules secondaires (spécifiques) contiennent la lactoferrine et le cytochrome b558.
- Les granules tertiaires (gélatinase) libèrent des enzymes favorisant la migration tissulaire.

Dans le contexte du sepsis, on observe une augmentation du nombre de neutrophiles immatures circulants (phénotype CD10 dim/CD16 dim), traduisant une mobilisation précoce de cellules médullaires. Ces cellules présentent une activité microbicide diminuée, une phagocytose altérée et une capacité réduite à produire des espèces réactives de l'oxygène (Demaret et al., 2015; Drifte et al., 2013; Orr et al., 2005). Leur proportion élevée est corrélée à une immunosuppression prolongée et à une augmentation de la mortalité (Guérin et al., 2014).

3.4.3. Recrutement des neutrophiles sur le site inflammatoire

Le recrutement des neutrophiles vers les tissus enflammés suit un processus en plusieurs étapes, finement régulées :

1. **Margination et roulade** : Sous l'effet des cytokines et médiateurs inflammatoires (histamine, TNF-α, IL-1β, PGE2), les cellules endothéliales expriment des molécules d'adhésion de type sélectines (E- et P-sélectines), favorisant une interaction transitoire avec les neutrophiles circulants.
2. **Adhésion ferme** : Les chimiokines, notamment CXCL8 (IL-8), induisent un changement de conformation des intégrines β2 (Mac-1, LFA-1), permettant une adhésion stable via l'ICAM-1 et la VCAM-1.
3. **Diapédèse** : Les neutrophiles traversent l'endothélium par voie paracellulaire ou transcellulaire, guidés par un gradient chimiotactique.
4. **Migration interstitielle** : Ils rejoignent la zone inflammatoire en raison de leurs propriétés amiboïdes, qui leur permettent de se déplacer activement à travers les tissus.

3.4.4. Mécanismes d'action des neutrophiles

a) Phagocytose

Les neutrophiles reconnaissent les pathogènes grâce à leurs récepteurs aux immunoglobulines (FcγR) et aux fragments du complément (CR1, CR3). La phagocytose aboutit à la formation d'un phagosome, qui fusionne avec des granules lysosomales. Cette étape entraîne la destruction du microbe via des enzymes telles que la myélopéroxydase ou la cathepsine G (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Dans les états septiques, la phagocytose des neutrophiles est globalement conservée, mais les formes immatures présentent une efficacité réduite (Drifte et al., 2013).

b) Explosion oxydative

La NADPH oxydase, activée à la membrane du phagosome, produit des radicaux libres : superoxyde, peroxyde d'hydrogène, hypochlorite, nécessaires à la destruction intracellulaire des pathogènes (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Chez les patients en sepsis, la production de ROS est significativement réduite à distance de l'épisode aigu. Cette baisse est corrélée à une diminution du contenu intracellulaire en myélopéroxydase et en lactoferrine (Demaret et al., 2015).

L'explosion oxydative déficiente est associée à un risque accru de décès (Demaret, 2016).

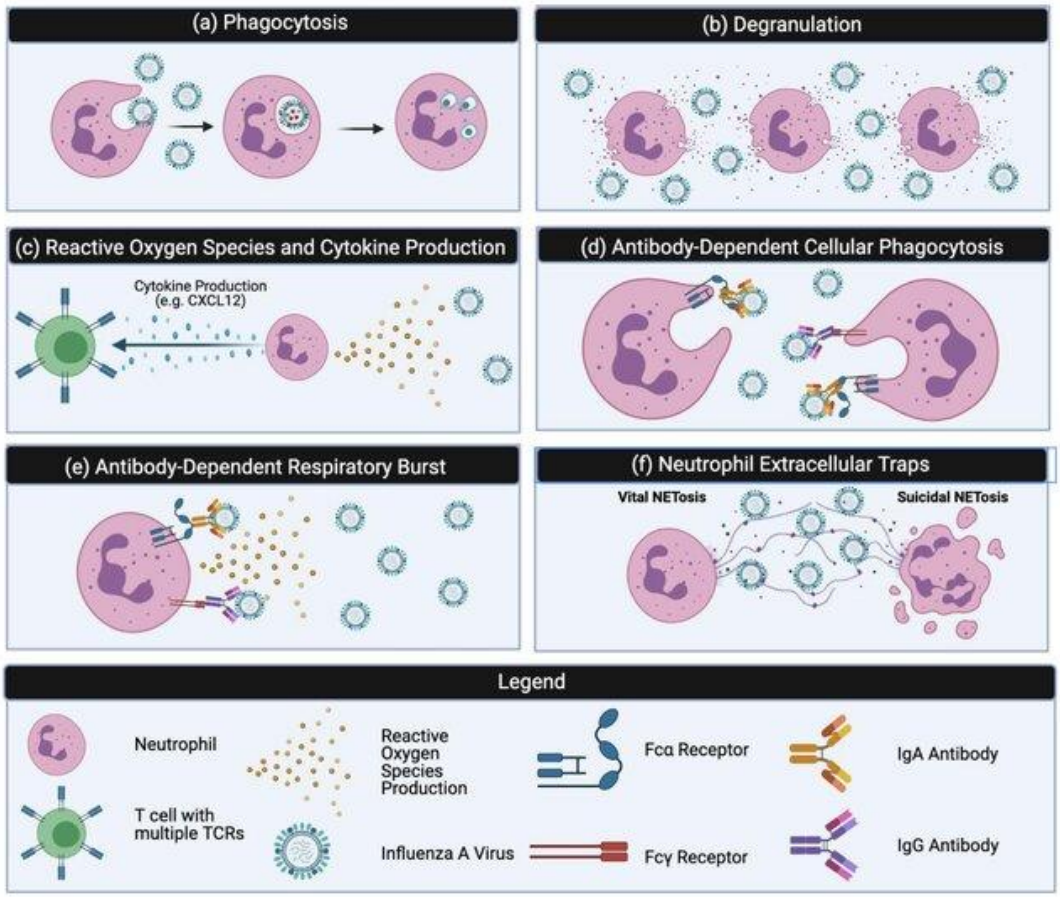


Figure 5: Schéma des mécanismes d'actions des neutrophiles *(source :(George et al., 2021))*
(a) Phagocytose : les neutrophiles avalent les microbes pour les détruire. (b) Dégranulation : ils libèrent des substances toxiques stockées dans de petits sacs pour tuer les microbes. (c) Espèces réactives de l'oxygène : ils produisent des molécules spéciales qui peuvent attaquer les microbes, soit à l'intérieur, soit à l'extérieur de la cellule. (d) Les cytokines sont de petites protéines libérées par les cellules qui servent à communiquer entre elles et à coordonner leurs actions. (e) La phagocytose cellulaire dépendante des anticorps se produit quand un anticorps se lie à un microbe, ce qui permet au neutrophile de l'englober. (f) Les bouffées respiratoires dépendantes des anticorps ont lieu quand un anticorps se lie à un microbe, déclenchant la production de molécules toxiques (ROS) pour le détruire. (g) Les pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs) sont composés de filets d'ADN qui sont libérés par les neutrophiles pour attraper les microbes. Dans la NETose suicidaire, le neutrophile meurt en libérant ces filets. Dans la NETose vitale, le neutrophile reste vivant et peut continuer à fonctionner

c) Sécrétion de médiateurs

Les neutrophiles libèrent des médiateurs solubles : cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β), chimiokines (CXCL8), enzymes protéolytiques (élastase, gélatinase), amplifiant l'inflammation locale et recrutant d'autres cellules immunitaires.

d) NETosis

En réponse à des stimuli puissants (bactéries, IL-8, LPS), les neutrophiles peuvent former des NETs (Neutrophil Extracellular Traps), qui représentent des réseaux extracellulaires composés d'ADN, d'histones et d'enzymes antimicrobiennes (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Ces structures permettent de piéger et tuer les pathogènes extracellulaires, mais leur formation excessive peut être délétère, favorisant l'auto-immunité, la thrombose et les lésions endothéliales (Brinkmann et al., 2004).

3.4.5. Régulation des neutrophiles

La réponse neutrophilique doit être rigoureusement contrôlée pour éviter une inflammation chronique ou des dommages collatéraux.

- **Apoptose** : Après avoir accompli leur mission, les neutrophiles subissent une mort cellulaire programmée.
- **Clearance par les macrophages** : Les neutrophiles apoptotiques sont éliminés silencieusement par les macrophages tissulaires, ce qui induit la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF-β).
- **Résolvines et lipoxines** : Ces médiateurs lipidiques pro-résolutifs limitent la durée et l'intensité de l'activation des neutrophiles.

3.4.6. Rôles pathologiques

- **Maladies auto-immunes** : Dans le lupus érythémateux systémique, la formation excessive de NETs stimule la production d'auto-anticorps (Brinkmann et al., 2004).
- **Polyarthrite rhumatoïde** : Les neutrophiles présents dans les articulations libèrent des enzymes protéolytiques qui dégradent le cartilage.
- **BPCO et fibrose pulmonaire** : Une activation neutrophilique persistante contribue à la dégradation du tissu pulmonaire (Borregaard, 2010).
- **Sepsis** : L'association d'une libération massive de neutrophiles immatures, d'une diminution du burst oxydatif, d'une altération de la chimiotaxie et d'une diminution de la fonction microbicide favorise une immunosuppression prolongée, propice aux infections secondaires et à la mortalité en réanimation (Demaret et al., 2015; Guérin et al., 2014).

Ainsi, les neutrophiles jouent un rôle pivot dans l'inflammation aiguë et chroniques et leurs altérations fonctionnelles dans des contextes pathologiques, en font une cible thérapeutique majeure. Cette synthèse met en évidence l'importance de réguler leur activation pour limiter les effets délétères de l'inflammation.

4. Les cytokines : messagers moléculaires de l'inflammation

Les cytokines sont des protéines de signalisation clefs qui orchestrent la réponse inflammatoire. Elles sont sécrétées par diverses cellules immunitaires et exercent des effets multiples en fonction du contexte et du type cellulaire cible (Cui et al., 2024).

4.1 Cytokines pro-inflammatoires

4.1.1 Généralités

Les cytokines pro-inflammatoires sont des médiateurs solubles essentiels à l'initiation, à l'orchestration et à la propagation de la réaction inflammatoire. Elles sont produites majoritairement par les cellules sentinelles de l'immunité innée, comme les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales, mais aussi par les neutrophiles et les fibroblastes. Ces cytokines assurent une communication rapide entre les cellules immunitaires et coordonnent les mécanismes cellulaires, humoraux et vasculaires de la phase aiguë.

Parmi les cytokines les plus importantes figurent le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α), l'interleukine-1β (IL-1β) et l'interleukine-6 (IL-6). Ces trois molécules agissent de manière synergique pour amplifier la réponse inflammatoire et en assurer la diffusion locale et systémique (Borregaard, 2010; Demaret, 2016).

La libération de ces cytokines est induite par l'activation des récepteurs de type Toll (TLR) présents sur les cellules de l'immunité innée. Ces récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) ou aux lésions cellulaires (DAMPs). L'activation des TLR conduit à la stimulation de voies de signalisation intracellulaire, notamment la voie NF-κB, qui induit la transcription de gènes pro-inflammatoires codant pour TNF-α, IL-1β, IL-6, des chimiokines, ainsi que des enzymes pro-inflammatoires telles que COX-2 et iNOS (Borregaard, 2010).

4.1.2 Rôle et fonctions des cytokines majeures :

- **Le TNF-α** est l'une des premières cytokines relarguées en réponse à une agression. Il active l'endothélium vasculaire en stimulant l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1), augmente la perméabilité vasculaire, favorise la migration leucocytaire, et agit également sur l'hypothalamus pour induire la fièvre.
- **L'IL-1β**, produite sous forme inactive (pro-IL-1β), est clivée en forme active par la caspase-1 dans le cadre de l'activation de l'inflammasome. Elle renforce l'effet du TNF-α en induisant la fièvre, en stimulant la libération de prostaglandines E2, et en augmentant la production de médiateurs pro-inflammatoires. Elle participe aussi à l'activation des nocicepteurs, expliquant en partie la douleur inflammatoire.

- **L'IL-6** a un rôle plus systémique. Elle induit la production des protéines de la phase aiguë par le foie, telles que la protéine C-réactive (CRP), le fibrinogène, ou encore la sérum amyloïde A. Elle agit aussi sur la maturation des lymphocytes B et la stimulation des cellules T, tout en intervenant dans la régulation de l'hématopoïèse. Son profil cinétique rapide en fait un biomarqueur précoce de la réponse inflammatoire (Demaret et al., 2015; Gouel-Chéron et al., 2012).

4.1.3 Manifestations biologiques et physiopathologiques

L'action combinée de ces cytokines déclenche les **signes cardinaux suivant de l'inflammation aiguë** :

- **Chaleur** et **rougeur** : liées à la vasodilatation locale ;
- **Œdème** : conséquence de l'augmentation de la perméabilité vasculaire ;
- **Douleur** : causée par la sensibilisation des terminaisons nerveuses périphériques ;
- **Fièvre** : induite par l'action du TNF-α et de l'IL-1β sur le centre thermorégulateur hypothalamique ;
- **Perte de fonction** : liée à l'inhibition locale de l'activité tissulaire.

Ces cytokines jouent également un rôle dans l'activation et le recrutement des leucocytes vers le site inflammatoire par l'induction de chimiokines (comme CXCL8/IL-8) et de molécules d'adhésion. Elles permettent ainsi une réponse cellulaire rapide et localisée à l'agression.

La **réponse systémique** à ces cytokines comprend des effets tels que :

- L'augmentation de la synthèse hépatique des protéines de la phase aiguë,
- La mobilisation du fer et du zinc, l'élévation de la température corporelle,
- La stimulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

Ces médiateurs doivent cependant être strictement régulés dans le temps et dans l'espace. Leur production est inhibée par des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 et TGF-β, ou encore par des protéines de signalisation inhibitrices intracellulaires. En absence de cette régulation, une réponse inflammatoire excessive peut engendrer des dommages tissulaires importants.

Enfin, selon Zeilhofer, les cytokines, TNF-α, IL-1β et IL-6 sont des acteurs majeurs de la coordination de la phase aiguë, responsables de la fièvre, de la douleur et de la signalisation endothéliale, permettant une réaction en chaîne efficace du système immunitaire (Zeilhofer & Schorr, 2000).

5. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les ROS sont des molécules instables contenant de l'oxygène, produites en quantité importante lors de l'inflammation. Elles sont générées principalement par les neutrophiles et macrophages activés dans le cadre du burst oxydatif, et grâce à des enzymes comme la NADPH oxydase (Magnani & Mattevi, 2019; Murphy, 2009).

Ces molécules, bien qu'utiles pour détruire les pathogènes, peuvent causer des dommages importants aux composants cellulaires (membranes, protéines, ADN) et activer des voies de signalisation pro-inflammatoires (J. Zhang et al., 2016).

Pour limiter ces effets délétères, l'organisme utilise des systèmes antioxydants enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase) et non enzymatiques (glutathion, vitamines C et E, flavonoïdes) (Birben et al., 2012; Ray et al., 2012).

Un déséquilibre dans ce processus conduit à un stress oxydatif qui favorise la persistance et l'aggravation de l'inflammation.

6. Exacerbation de la réponse inflammatoire

L'inflammation est une réaction protectrice essentielle, mais lorsqu'elle devient excessive, elle peut causer des dommages importants aux tissus et conduire à des pathologies chroniques.

6.1 Mécanismes conduisant à une exacerbation

L'exacerbation peut provenir de plusieurs facteurs :

- **Persistance de l'agent pathogène ou du stimulus** : une infection chronique ou une exposition prolongée à un irritant (ex : tabac, polluants) maintient la stimulation inflammatoire.
- **Dérèglement des mécanismes de résolution** : normalement, la résolution de l'inflammation implique des médiateurs anti-inflammatoires (IL-10, TGF-β) et l'élimination des cellules inflammatoires (apoptose des neutrophiles). Leur dysfonction peut prolonger la phase active (Serhan et al., 2008).
- **Activation excessive des cellules immunitaires** : notamment les macrophages et lymphocytes, qui produisent en excès des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β, IFN-γ).

6.2 Polarisation des lymphocytes T et implication dans l'exacerbation

Les lymphocytes T CD4+ peuvent se différencier en différentes sous-populations selon le contexte cytokinique :

- **Th1** : sécrètent de l'IFN-γ, activent les macrophages, favorisent la réponse cellulaire contre les pathogènes intracellulaires. Une polarisation Th1 excessive est impliquée dans les maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques ou la polyarthrite rhumatoïde. Cette activation chronique favorise la production prolongée de cytokines inflammatoires, induisant des lésions tissulaires (Berger, 2000).
- **Th2** : produisent de l'IL-4, IL-5, IL-13, favorisant la production d'anticorps et la réponse aux parasites. Une prédominance des Th2 est associée aux maladies allergiques et à l'asthme, provoquant une inflammation chronique des voies respiratoires (Cavaillès et al., 2008).
- **Th17** : produisent IL-17, elles sont très impliquées dans l'inflammation chronique et les pathologies auto-immunes, avec un fort recrutement de neutrophiles.

Un déséquilibre dans ces polarités, en faveur d'une réponse pro-inflammatoire, peut aggraver et prolonger la réaction inflammatoire.

6.3 Conséquences de l'exacerbation

Une inflammation non contrôlée peut entraîner :

- **Destruction tissulaire** : par libération excessive d'enzymes protéolytiques, radicaux libres et médiateurs cytotoxiques.
- **Fibrose** : réparation anarchique avec accumulation de tissu cicatriciel, perte de fonction (ex. fibrose pulmonaire).
- **Développement de maladies chroniques** : inflammation prolongée favorise l'apparition de pathologies telles que l'athérosclérose, certaines formes de cancer, maladies neurodégénératives (Nathan, 2002).

6.4 Contrôle de l'exacerbation

Pour limiter l'exacerbation, l'organisme met en place des mécanismes régulateurs :

- Production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF-β).
- Activation de la résolution active, avec des lipides spécialisés pro-résolution (résolvines, protectines).
- Apoptose et clairance des cellules inflammatoires.
- Intervention des cellules T régulatrices (Tregs) pour supprimer l'activité excessive des autres lymphocytes.

Le déséquilibre de ces mécanismes est au cœur des pathologies inflammatoires chroniques, ce qui fait de leur compréhension un enjeu majeur pour la recherche thérapeutique.

7. Le rôle de l’angiogenèse dans l’inflammation persistante

L’angiogenèse, formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, accompagne souvent l’inflammation chronique. Elle répond à la demande accrue en oxygène liée à l’infiltration cellulaire et à l’hypoxie locale.

L’activation du facteur HIF-1α sous hypoxie stimule la production du VEGF et d’autres facteurs pro-angiogéniques (Jain, 2001). Les cytokines inflammatoires, notamment IL-1β, TNF-α et TGF-β, renforcent ce processus (Hellwig-Bürgel et al., 1999; McMahon et al., 2006).

L’angiogenèse permet l’apport continu de nutriments et le recrutement de cellules immunitaires, mais elle peut aussi contribuer au maintien et à la dissémination de l’inflammation en créant un réseau vasculaire désorganisé et perméable (Pinsky et al., 1996).

L’ensemble de ces données démontrent que la réponse inflammatoire est un processus complexe et dépendant de plusieurs facteurs moléculaires et cellulaires, dont le principal est l’angiogenèse qui possède une régulation et un fonctionnement aussi complexe que l’inflammation.

Chapitre 2 : Angiogenèse et cellules endothéliales

L'angiogenèse constitue un élément fondamental de la réponse inflammatoire en facilitant à la fois le maintien et la résolution de l'inflammation selon le contexte. Lors d'un processus inflammatoire, l'angiogenèse est activée pour favoriser l'apport accru en oxygène, nutriments et cellules immunitaires vers les tissus affectés. Ce mécanisme est orchestré par une balance fine entre des facteurs pro-angiogéniques et des facteurs anti-angiogéniques. Les cellules endothéliales, quant à elles, sont des acteurs centraux de ce processus, répondant à ces signaux moléculaires en proliférant, migrant et en formant de nouveaux capillaires.

Partie 1 : L'angiogenèse

1. Définition de l'angiogenèse

L'angiogenèse désigne le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Ce phénomène hautement orchestré est indispensable à la survie des organismes multicellulaires, car il permet d'assurer un apport suffisant en oxygène et en nutriments aux tissus, tout en facilitant l'élimination des déchets métaboliques. Sur le plan physiologique, l'angiogenèse est cruciale à plusieurs moments de la vie : elle intervient durant le développement embryonnaire pour la formation du système vasculaire, dans les processus de cicatrisation et de régénération tissulaire, ainsi qu'en réponse à des situations d'ischémie (manque d'oxygène dans un tissu)(Risau, 1997; Carmeliet, 2003; Potente et al., 2011).

Contrairement à la vasculogenèse, qui correspond à la formation de vaisseaux à partir de précurseurs mésodermiques lors de l'embryogenèse, l'angiogenèse repose sur le bourgeonnement de capillaires existants (Potente et al., 2011). Ce processus est particulièrement actif durant certaines phases du cycle ovarien, la grossesse, la croissance osseuse, ou la réparation post-traumatique. Dans ces contextes, il constitue un phénomène physiologique strictement régulé.

Cependant, l'angiogenèse peut aussi se produire dans un cadre pathologique. Dans certaines maladies, comme les cancers, la rétinopathie diabétique, la polyarthrite rhumatoïde ou l'athérosclérose, ce processus devient anarchique, désorganisé ou excessif, contribuant alors à la progression de la pathologie (Carmeliet, 2005).

La régulation de l'angiogenèse repose sur un équilibre dynamique entre des signaux pro-angiogéniques (favorisant la croissance vasculaire) et des signaux anti-angiogéniques (inhibant ou limitant cette croissance) (Maisonpierre et al., 1997; Ferrara et al., 2003; Presta et al., 2005). Cet équilibre est influencé par divers facteurs :

- **Les facteurs solubles**, tels que les facteurs de croissance (ex. VEGF, FGF, PlGF), les cytokines, les chimiokines.
- **Les cellules endothéliales**, capables de moduler leur comportement en fonction de signaux environnementaux.
- **La matrice extracellulaire**, qui agit à la fois comme support physique et comme réservoir de signaux bioactifs.

Les étapes de l'angiogenèse comprennent l'activation, la prolifération, la migration des cellules endothéliales, la formation de tubes vasculaires, puis leur maturation et leur stabilisation par les cellules périvasculaires (péricytes et cellules musculaires lisses). Chacune de ces étapes repose sur une cascade de signalisations complexes et sur l'interaction entre de nombreux types cellulaires et moléculaires. Le processus est ainsi à la fois spatialement localisé et temporellement limité pour garantir une vascularisation fonctionnelle adaptée.

Sur le plan clinique, comprendre les mécanismes de l'angiogenèse a ouvert la voie à de nombreuses stratégies thérapeutiques, aussi bien pour inhiber l'angiogenèse dans le cas de tumeurs malignes, que pour la stimuler dans les situations d'ischémie chronique ou de retard de cicatrisation. L'enjeu thérapeutique réside dans la capacité à moduler finement ce processus en fonction du contexte physiopathologique.

Dans les sections suivantes, nous allons explorer en détail les différentes étapes de l'angiogenèse, leurs régulateurs moléculaires et cellulaires, ainsi que les dérèglements associés aux pathologies humaines.

2. Étapes du processus angiogénique

a. Activation des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales quiescentes deviennent activées en réponse à des stimuli pro-angiogéniques, notamment le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), produit localement sous hypoxie. L'activation du récepteur VEGFR-2 entraîne une cascade intracellulaire via les voies PI3K/AKT, MAPK/ERK et PLCγ, favorisant la prolifération, la survie et la migration cellulaire (**Figure 6**) (Gerhardt et al., 2003).

Les jonctions intercellulaires se relâchent (notamment via la VE-cadhérine), rendant les cellules plus mobiles (Gerhardt et al., 2003; Hellström et al., 2007).

b. Dégradation de la matrice extracellulaire

Les cellules activées sécrètent des métalloprotéinases matricielles (MMPs), comme MMP-2 et MMP-9, qui dégradent la lame basale et la matrice extracellulaire (MEC), facilitant ainsi la migration. Ces enzymes libèrent également des facteurs pro-angiogéniques stockés dans la MEC, amplifiant la signalisation locale. Leur activité est régulée par les inhibiteurs endogènes TIMPs (Overall & Kleifeld, 2006).

c. Prolifération des cellules endothéliales

Sous l'effet du VEGF et d'autres facteurs comme le FGF-2 (Presta et al., 2005), les cellules endothéliales prolifèrent activement. Cette étape est médiée par l'activation des voies de signalisation favorisant l'entrée en cycle cellulaire, en particulier via les cyclines et CDKs. La prolifération fournit un pool suffisant de cellules pour l'élongation du vaisseau naissant (Presta et al., 2005).

d. Migration cellulaire

Les cellules migrent selon un gradient de VEGF, guidées par leurs filopodes (**Figure 6**). Les intégrines (αvβ3, α5β1) permettent l'ancrage temporaire à la MEC, tandis que les GTPases (Rac1, Cdc42) contrôlent la dynamique du cytosquelette. Les cellules tip migrent en avant, suivies par les cellules stalk qui forment la colonne vasculaire (Lamalice et al., 2007).

e. Formation du tube vasculaire

Les cellules endothéliales alignées forment progressivement une lumière par des mécanismes de vacuolisation, coalescence de vésicules intracellulaires et réorganisation apico-basale. L'intégrité du tube est consolidée par des jonctions serrées et adhérentes, tout en conservant une plasticité pour ajuster le calibre (Strilić et al., 2009).

f. Maturation et stabilisation

Les péricytes et cellules musculaires lisses sont recrutés via le PDGF-BB et le TGF-β. Ils stabilisent la structure vasculaire, diminuent la perméabilité et assurent la contractilité (**Figure 6**). Cette phase implique aussi le dépôt de nouvelle MEC (collagène IV, laminine), et le retour à un phénotype endothélial quiescent (via angiopoïétine-1 et Tie2) (Hellström et al., 2007; Maisonpierre et al., 1997).

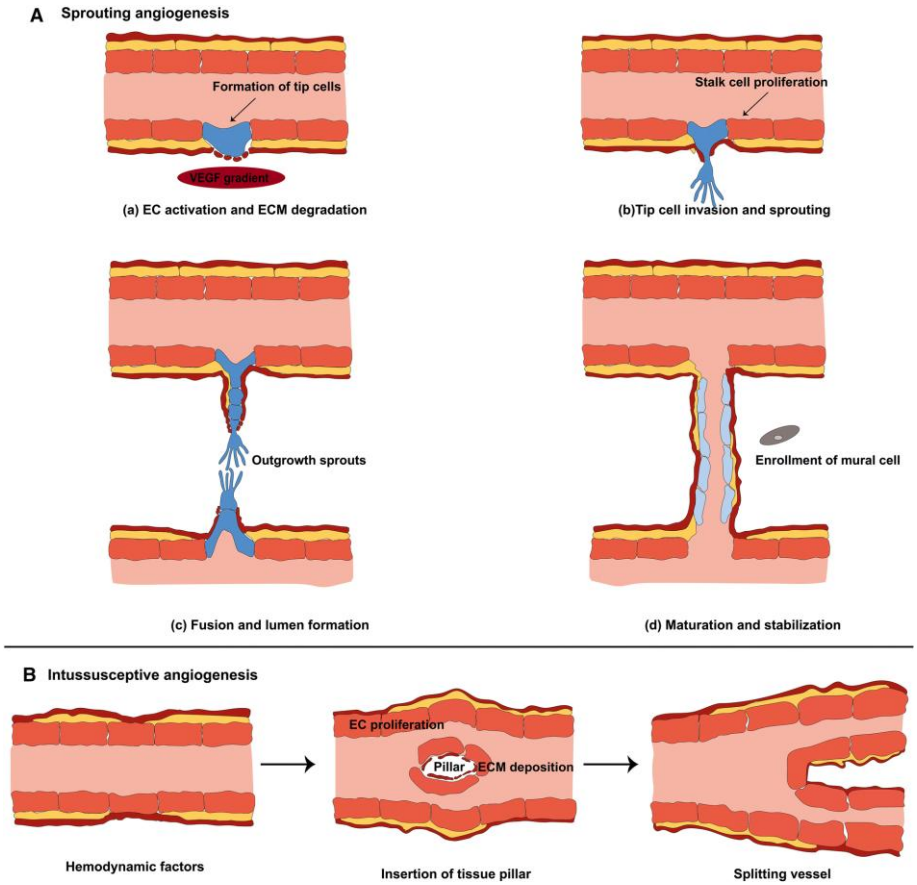


Figure 6 Schéma illustrant le processus de bourgeonnement angiogénique *(Source : Mahdi Ahmadi & Jafar Rezaie 2020) :*
A différenciation des cellules endothéliales en tip cells et stalk cells sous l'effet de VEGF-A et du gradient chimique, régulation du phénotype via la voie Notch/Dll4, dégradation de la MEC par les MMPs, migration des tip cells avec formation de filopodes, et prolifération des stalk cells formant le corps du néovaisseau. Le tout est suivi de l'anastomose, de la formation de lumière (lumen) et de la stabilisation par les péricytes.

3. Régulation moléculaire de l'angiogenèse

L'angiogenèse repose sur un équilibre précis entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. Le facteur le plus étudié est le VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A), mais il agit en synergie avec FGF-2, PlGF, PDGF-BB et angiopoïétines (**Figure 7**) (Ferrara et al., 2003; Presta et al., 2005). Ces facteurs activent leurs récepteurs à tyrosine kinase, déclenchant des cascades intracellulaires spécifiques. Les microARNs, les HIFs (hypoxia inducible factors), et les modifications épigénétiques régulent aussi l'expression de ces facteurs.

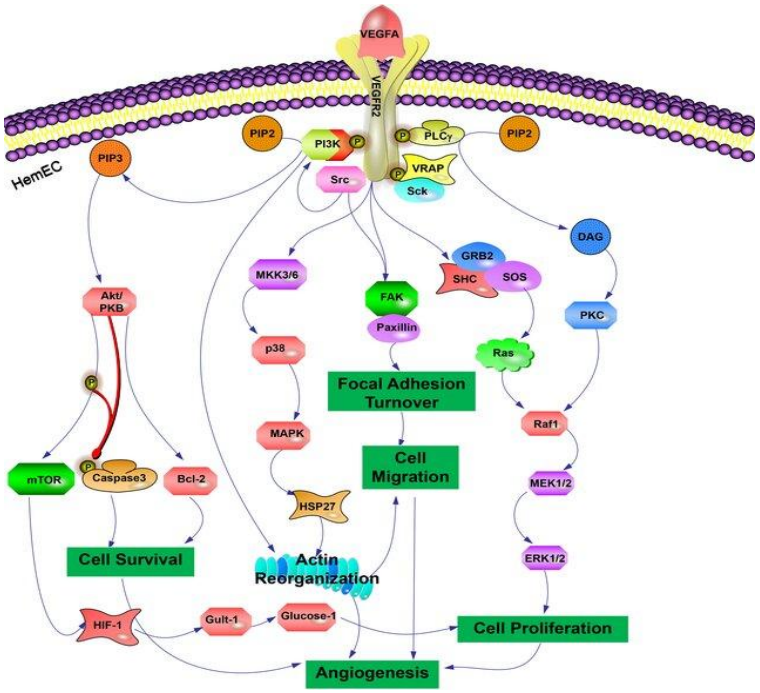


Figure 7 Signalisation VEGF/VEGFR-2 → PI3K/AKT / MAPK (*Source : Kong et al.,2023)*

Parmi les inhibiteurs endogènes, on trouve la thrombospondine-1, l'endostatine, et l'angiostatine (Ferrara et al., 2003; Lawler, 2002; O'Reilly, 1997). Leur rôle est crucial pour éviter une néovascularisation excessive, comme dans les tumeurs ou les pathologies inflammatoires chroniques (**Tableau 1**).

Tableau 1 Principaux facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques impliqués dans la régulation vasculaire

Facteurs pro-angiogéniques	**Facteurs anti-angiogéniques**	**Références**
VEGF-A, VEGF-B, PlGF	Thrombospondine-1 (TSP-1)	Ferrara et al., 2003
FGF-2	Endostatine	O'Reilly et al., 1997
PDGF-BB	Angiostatine	Miao et al., 2000
Angiopoïétine-1	Angiopoïétine-2 (en l'absence de VEGF)	Maisonpierre et al., 1997
IL-8, CXCL1	IFN-γ	Folkman, 2007
HIF-1α	TIMPs	Brew et al., 2000

4. Régulation cellulaire

La régulation de l'angiogenèse implique une coopération entre cellules endothéliales, péricytes, cellules musculaires lisses, macrophages, cellules dendritiques, et fibroblastes (Ribatti et al., 2011). Les macrophages produisent des VEGF, les péricytes stabilisent les vaisseaux, et les cellules immunitaires modulatrices influencent l'inflammation locale, qui elle-même rétroagit sur l'angiogenèse.

5. L'angiogenèse dans les pathologies humaines

Un excès d'angiogenèse est impliqué dans les cancers, la rétinopathie diabétique, l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis. Une angiogenèse insuffisante est observée dans l'ischémie cardiaque, les plaies chroniques et les maladies neurodégénératives. Ces dérégulations ont conduit au développement de traitements ciblant l'angiogenèse, comme les anti-VEGF (bévacizumab, ranibizumab) (Carmeliet, 2005; Folkman, 2007).

6. Conclusion de la Partie 1

L'angiogenèse est un processus dynamique, complexe et régulé, central pour le développement, la réparation tissulaire et de nombreuses pathologies. Sa compréhension ouvre la voie à des stratégies thérapeutiques innovantes et ciblées.

Comprendre l'angiogenèse nécessite de s'intéresser de près aux cellules qui en sont les principales effectrices : les cellules endothéliales. Celles-ci, par leur diversité, leur plasticité et leur réactivité aux signaux inflammatoires, constituent une interface dynamique entre les besoins des tissus et les signaux circulants. La Partie 2 explore en profondeur leurs propriétés

Partie 2 : Le tissu endothélial

Les mécanismes inflammatoires décrits précédemment mettent en lumière le rôle central de l'endothélium comme interface entre la circulation et les tissus. Sa capacité à percevoir, intégrer et moduler les signaux inflammatoires en fait un acteur majeur de l'homéostasie et des pathologies chroniques.

1. Définition

Le tissu endothélial est un épithélium monocouche spécialisé qui tapisse l'intérieur de l'ensemble du réseau vasculaire, qu'il soit sanguin ou lymphatique. Ce tissu, bien qu'extrêmement fin (environ 1µm d'épaisseur), joue un rôle central dans de nombreuses fonctions physiologiques et pathologiques. L'endothélium assure notamment la régulation du tonus vasculaire, la perméabilité capillaire, le contrôle de la coagulation, la réponse immunitaire, ainsi que la croissance et la réparation vasculaires (Cines et al., 1998).

Loin d'être un simple revêtement passif, il s'agit d'un organe endocrine, paracrine et autocrine à part entière, capable d'adapter rapidement son phénotype selon les contraintes hémodynamiques ou les stimuli environnementaux.

2. Structure histologique des vaisseaux

On distingue les artères et les veines.

a. Les artères :

Elles comportent trois couches concentriques (**Figure 8**) :

- L'intima, en contact direct avec le sang, est une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale. Elle est sensible aux forces mécaniques et aux changements de composition sanguine (Davidson & Duchen, 2007).
- La média, formée de cellules musculaires lisses (CML) et de fibres d'élastine et de collagène, permet la modulation du tonus vasculaire par des interactions endothélium–CML (Rossaint et al., 1993; Wagenvoort & Wagenvoort, 1982). Cette couche s'amincit avec la réduction du calibre vasculaire (Seidelmann et al., 2014).
- L'adventice, couche externe, contient une matrice extracellulaire, des cellules immunitaires, des vasa vasorum (petits vaisseaux de l'adventice des artères et des veines dont le diamètre dépasse 1 millimètre), ainsi que des terminaisons nerveuses permettant une

régulation par le système parasympathique (Adams & Alitalo, 2007; Libby et al., 2011; Stenmark et al., 2011).

b. Les veines :

Bien que structurées en trois tuniques similaires (**Figure 8**), elles possèdent une paroi beaucoup plus fine et extensible, favorisant un retour veineux souple et modulable (Alberts et al., 2002; Cleaver & Melton, 2003).

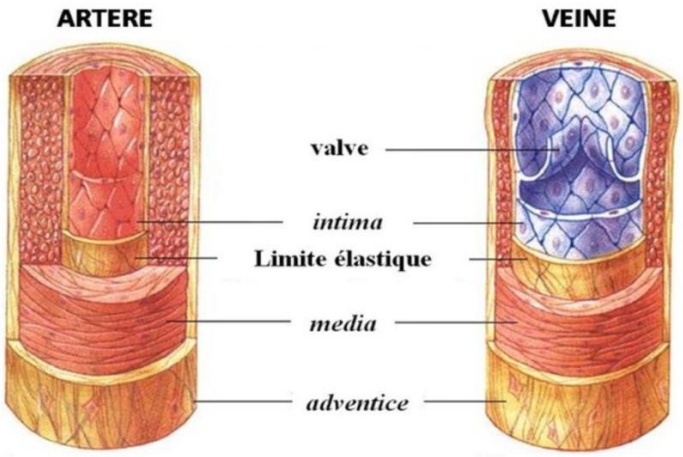


Figure 8: Architecture de la paroi artérielle et veineuse *(source Billoir, 2020).*

Ainsi, bien que partageant une architecture vasculaire classique en trois tuniques, les vaisseaux pulmonaires présentent des caractéristiques adaptées à leur fonction d'échange gazeux et à leur environnement à faible pression. Ces particularités influencent directement le comportement des cellules endothéliales qu'ils hébergent.

3. Les cellules endothéliales macrovasculaires et microvasculaires : différences, fonctions et spécificités

L'endothélium n'est pas une entité homogène. En fonction de la localisation vasculaire (macro- ou microvasculaire), les cellules endothéliales présentent des propriétés morphologiques, fonctionnelles et moléculaires très différentes (Aird, 2007a, 2007b).

a. Introduction générale

Les cellules endothéliales (CE) forment la fine couche qui tapisse la lumière de tous les vaisseaux sanguins, du cœur jusqu'aux plus petits capillaires. Ces cellules jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie vasculaire, en participant à la régulation du tonus des vaisseaux, la perméabilité, la coagulation, ainsi que la réponse inflammatoire et immunitaire (van Hinsbergh, 2012). Cependant, les propriétés fonctionnelles et moléculaires

des CE sont loin d'être uniformes (**Figure 9**). Elles varient en fonction de la taille et du type des vaisseaux qu'elles recouvrent, mais également selon la localisation anatomique et l'organe concerné.

Cette hétérogénéité reflète l'adaptation fine des cellules endothéliales aux contraintes mécaniques spécifiques (comme la pression sanguine et le cisaillement), mais aussi aux exigences métaboliques et fonctionnelles des tissus environnants (Aird, 2007a; Davies, 1995).

Ainsi, une distinction majeure est faite entre les cellules endothéliales des gros vaisseaux, dites macrovasculaires, et celles des petits vaisseaux, dites microvasculaires. Comprendre ces différences est essentiel, car elles conditionnent non seulement la physiologie normale de la circulation, mais aussi les réponses aux stimuli pathologiques, notamment dans l'angiogenèse, la réparation tissulaire ou les maladies vasculaires.

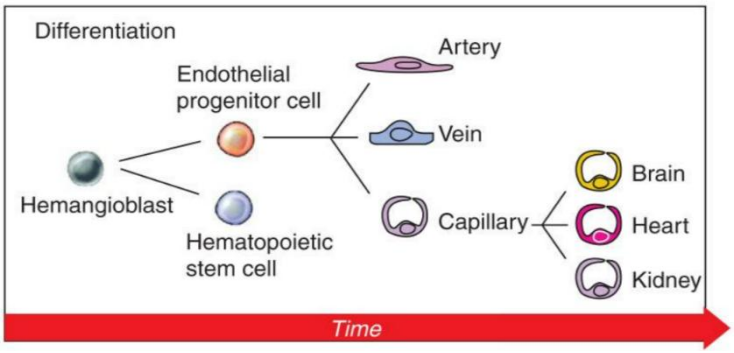


Figure 9 Hétérogénéité des cellules endothéliales *(source : Aird, 2012)*
Schéma illustrant le processus de différenciation des cellules à partir du hemangioblast, une cellule souche commune. Le hemangioblast donne naissance à des cellules progénitrices endothéliales et à des cellules souches hématopoïétiques. Les cellules progénitrices endothéliales se différencient ensuite en cellules formant les artères, veines et capillaires, tandis que les capillaires peuvent se spécialiser davantage pour former des tissus spécifiques tels que le cerveau, le cœur et les reins, en fonction des besoins locaux et du temps de développement

b. *Cellules endothéliales macrovasculaires (CEMA) : Fonctionnement et spécificités*

Les cellules endothéliales macrovasculaires tapissent les grandes artères, veines et certaines veinules postcapillaires. Ces vaisseaux sont soumis à des forces mécaniques importantes, telles que la pression artérielle pulsatile et le cisaillement sanguin élevé, qui nécessitent des adaptations morphologiques et fonctionnelles spécifiques (van Hinsbergh, 2012).

Sur le plan morphologique, les CEMA présentent une forme aplatie, optimisant la résistance aux forces de cisaillement. Leur cytosquelette est renforcé par des filaments d'actine et des protéines d'adhésion intercellulaires, ce qui leur permet de conserver leur intégrité face aux variations de flux sanguin et de pression (Davies, 1995).

Fonctionnellement, ces cellules jouent un rôle central dans la régulation du tonus vasculaire grâce à la sécrétion de substances vasoactives. Elles produisent notamment de l'oxyde nitrique (NO), un puissant vasodilatateur synthétisé par la NO synthase endothéliale (eNOS), qui agit sur les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire en induisant leur relaxation. Parallèlement, elles produisent de l'endothéline-1, un peptide vasoconstricteur qui module le tonus vasculaire dans le sens opposé.

Cet équilibre fin entre vasodilatation et vasoconstriction est essentiel pour maintenir une pression artérielle stable et adaptée aux besoins de l'organisme (Yanagisawa et al., 1988).

Au-delà du contrôle du tonus, les CEMA maintiennent une barrière hémato-tissulaire solide. Leur surface est caractérisée par des jonctions serrées et adhérentes rigoureuses, empêchant la fuite non contrôlée de plasma ou de cellules sanguines dans les tissus environnants.

Cette propriété est essentielle pour préserver la fonction normale des organes et éviter les œdèmes.

Sur le plan de l'homéostasie sanguine, les CEMA exercent un rôle antithrombotique en produisant des substances inhibitrices de l'activation plaquettaire et de la coagulation, comme la prostacycline et la thrombomoduline. Cependant, en cas de lésion vasculaire, elles peuvent rapidement s'activer pour exprimer des molécules pro-coagulantes afin de favoriser la réparation de la paroi vasculaire (Pober & Sessa, 2007).

Enfin, ces cellules participent activement à la réponse immunitaire. Lors d'un processus inflammatoire, elles s'activent pour exprimer des molécules d'adhésion leucocytaire, telles que les sélectines et les intégrines (ICAM-1, VCAM-1), qui facilitent le recrutement et le passage des cellules immunitaires à travers la paroi vasculaire vers les tissus lésés (Carlos & Harlan, 1994).

Une particularité notable des CEMA est leur capacité à moduler leur réactivité en fonction de la localisation vasculaire. Par exemple, les cellules endothéliales des artères exposées à un flux laminaire ont un profil anti-inflammatoire, tandis que celles des zones à flux turbulent adoptent un profil pro-inflammatoire et pro-atherogénique. Cette plasticité contribue à la localisation préférentielle des lésions athéroscléroses dans les zones de flux perturbé.

c. Cellules endothéliales microvasculaires (CEMi) : fonctionnement et spécificités

Les cellules endothéliales microvasculaires recouvrent les plus petits vaisseaux, tels que les capillaires, les veinules postcapillaires et les artérioles. Leur taille réduite et leur surface membranaire élevée favorisent les échanges de substances entre le sang et les tissus

environnants, ce qui est crucial pour la nutrition cellulaire, l'échange gazeux et l'élimination des déchets métaboliques.

Leur rôle principal est le contrôle de la perméabilité vasculaire. Contrairement aux CEMA, les CEMi présentent des jonctions intercellulaires plus dynamiques, constituées de complexes protéiques modulables comme les claudines et occludines des jonctions serrées, et les cadhérines des jonctions adhérentes.

Ces structures assurent une régulation fine du passage des liquides, macromolécules et cellules immunitaires, permettant ainsi une réponse adaptée aux besoins du microenvironnement tissulaire (Bazzoni & Dejana, 2004; Dejana, 2004; Komarova & Malik, 2010).

Par ailleurs, ces cellules participent activement aux échanges gazeux et nutritionnels, notamment dans les organes à forte activité métabolique, où la demande en oxygène et nutriments est élevée.

Les CEMi possèdent une capacité de réaction rapide aux stimuli locaux, notamment à l'hypoxie, à l'inflammation ou aux signaux mécaniques. Sous l'influence de ces stimuli, elles modifient leur expression génique, ce qui peut entraîner une augmentation de la perméabilité, la production de facteurs angiogéniques, ou encore la modulation de l'adhésion leucocytaire (Aird, 2007b).

Un autre aspect important des CEMi est leur interaction étroite avec les péricytes, cellules contractiles qui entourent les capillaires et veinules postcapillaires. Ces interactions sont fondamentales pour la stabilité, la maturation et la réparation vasculaire. En outre, les CEMi produisent et dégradent la matrice extracellulaire via des métalloprotéinases (MMPs), facilitant la migration cellulaire et la formation de nouveaux vaisseaux dans le cadre de l'angiogenèse (Armulik et al., 2005).

Enfin, il existe une hétérogénéité importante des CEMi selon l'organe ou le tissu. Par exemple, les cellules endothéliales cérébrales constituent une barrière hémato-encéphalique extrêmement restrictive, tandis que celles du foie sont fenestrées, favorisant ainsi des échanges rapides entre le sang et les hépatocytes (Nolan et al., 2013). Cette diversité fonctionnelle illustre l'adaptation des CEMi aux exigences spécifiques de leur environnement.

e. Synthèse des différences entre les cellules endothéliales macrovasculaires (CEMA) et microvasculaires (CEMi), fonctionnement et complémentarités

En résumé, les cellules endothéliales macro- et microvasculaires diffèrent non seulement par leur localisation anatomique et leur morphologie, mais aussi par leurs fonctions spécifiques et leur capacité d'adaptation aux stimuli. Les CEMA sont spécialisées dans la régulation du tonus vasculaire global, la prévention de la thrombose et la modulation de la réponse immunitaire systémique, adaptées à la gestion des forces hémodynamiques élevées. En revanche, les CEMi, notamment celles des poumons, sont centrées sur la régulation fine de la perméabilité, la facilitation des échanges métaboliques, et la capacité à répondre rapidement aux conditions locales comme l'hypoxie ou l'inflammation. Cette hétérogénéité est fondamentale pour le fonctionnement harmonieux du système vasculaire et la capacité de l'organisme à s'adapter à des besoins physiologiques variés. Elle explique aussi pourquoi certaines pathologies affectent préférentiellement des segments vasculaires spécifiques et ouvre la voie à des approches thérapeutiques ciblées, notamment dans le domaine de l'angiogenèse et des maladies vasculaires pulmonaires.

Le tableau suivant synthétise les principales différences entre les cellules endothéliales macro- et microvasculaires, y compris des aspects non détaillés dans le texte (**Tableau 2**).

f. Approches expérimentales et implications translationnelles

Les différences entre CEMA et CEMi doivent être systématiquement prises en compte lors de l'interprétation de résultats expérimentaux. Les HUVEC, bien que largement utilisées en recherche, ne reflètent pas toujours fidèlement les comportements des cellules microvasculaires en situation pathologique. À l'inverse, les CEMi, plus difficiles à cultiver, fournissent une modélisation plus fine des réponses tissulaires spécifiques (Nolan et al., 2013).

La compréhension de cette diversité endothéliale est donc fondamentale pour le développement de traitements ciblés : un anti-angiogénique efficace dans un lit vasculaire tumoral macrovasculaire ne l'est pas nécessairement dans un contexte de microangiopathie inflammatoire.

Tableau 2 Comparaison entre cellules endothéliales macrovasculaires (CEMA) et microvasculaires (CEMi)

Caractéristique	CEMA	CEMi	Référence
Localisation	Gros vaisseaux (aorte, veines, artères coronaires)	Capillaires, artérioles, veinules	Aird, 2007
Morphologie / Taille	Cellules larges, allongées, peu denses	Petites cellules, fortement connectées	Potente et al., 2011
Rôle vasculaire	Conduction du sang, régulation du débit et de la pression	Échange de gaz, nutriments, cellules et molécules	—
Perméabilité	Modérée à élevée selon le lit vasculaire	Faible (barrière plus serrée), résistance électrique élevée	Wojciak-Stothard et al., 2006
Marqueurs moléculaires	VCAM-1, eNOS, ICAM-1	Claudine-5, VE-cadhérine, ZO-1	Nolan et al., 2013
Adhésion cellulaire	Faible expression en condition basale	Forte expression de molécules d'adhésion (ex. ICAM-1, VCAM-1)	Aird, 2007
Sensibilité au flux	Forte sensibilité au shear stress (via KLF2, eNOS)	Moins sensible, mais activable par des facteurs tissulaires	Aird, 2007
Réponse aux stimuli inflammatoires (RTEE)	Activation rapide mais transitoire (via NF-κB)	Réponse rapide et amplifiée aux cytokines et facteurs inflammatoires	Huertas et al., 2018
Capacité angiogénique	Forte, activée par VEGF-A, FGF-2	Plus régulée, dépendante du microenvironnement local	Nolan et al., 2013
Rôle physiologique	Régulation du tonus vasculaire, de l'hémodynamique	Maintien des barrières, échanges tissulaires, immunosurveillance	Aird, 2007
Expression génique	Profil relativement stable	Profil très variable selon le tissu (cerveau, rein, peau, etc.)	Butler et al., 2013
Plasticité fonctionnelle	Plus limitée	Très plastique, s'adaptent facilement à l'environnement	Rafii et al., 2016
Spécificité tissulaire	Moins marquée	Fortement spécifique selon l'organe (ex. barrière hémato-encéphalique)	Butler et al., 2013
Capacité de prolifération	Faible à modérée	Élevée, surtout en condition d'hypoxie ou d'inflammation	Seano & Jain, 2020
Modèles in vitro courants	HUVEC, HAEC, HCAEC	HPMEC, HBMEC, HRMEC	Sobczak et al., 2013

d. Focus sur les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires (CEPM)

Le poumon, en tant que deuxième organe le plus vascularisé après le foie et le placenta, possède un réseau vasculaire complexe et dense, particulièrement au niveau du microvasculaire. Les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires (CEPM) tapissent la paroi des capillaires pulmonaires qui entourent les alvéoles, formant ainsi la barrière alvéolo-capillaire essentielle aux échanges gazeux.

Ces CEPM ont la particularité d'assurer une perméabilité très sélective. Leur fonction première est de permettre les échanges rapides et efficaces d'oxygène et de dioxyde de carbone entre l'air alvéolaire et le sang, tout en maintenant une barrière étanche qui empêche la fuite de plasma et de cellules sanguines dans les espaces aériens, évitant ainsi l'œdème pulmonaire (Weibel, 1963).

Sur le plan vasculaire, les CEPM participent activement à la régulation du tonus vasculaire pulmonaire en produisant plusieurs médiateurs vasoactifs. L'oxyde nitrique, synthétisé par la NO synthase endothéliale, induit la relaxation des muscles lisses vasculaires, favorisant la vasodilatation. Parallèlement, l'endothéline-1 agit comme un puissant vasoconstricteur, permettant un ajustement fin du débit sanguin pulmonaire en fonction des besoins ventilatoires (Nozik-Grayck et al., 2003).

En cas d'hypoxie locale, caractéristique de nombreuses pathologies pulmonaires, les CEPM activent la voie de l'HIF-1α (Hypoxia-Inducible Factor-1α), un facteur de transcription qui induit la production de VEGF, stimulant ainsi l'angiogenèse et favorisant l'adaptation du réseau vasculaire pulmonaire au déficit en oxygène (Semenza, 2012).

Les interactions entre CEPM, péricytes et matrice extracellulaire sont cruciales pour la stabilité et la réparation vasculaire après une lésion pulmonaire.

Ces interactions coordonnent la maturation des nouveaux vaisseaux et la restauration de la fonction barrière (Thébaud & Abman, 2007).

Sur le plan pathologique, la dysfonction des CEPM joue un rôle majeur dans diverses maladies pulmonaires. Par exemple, dans l'hypertension artérielle pulmonaire, ces cellules présentent une prolifération excessive et une résistance accrue aux signaux anti-prolifératifs, contribuant à un remodelage vasculaire destructeur. De plus, dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), une augmentation anormale de la perméabilité endothéliale pulmonaire entraîne un œdème sévère, compromettant les échanges gazeux et aggravant l'insuffisance respiratoire (Ware & Matthay, 2000).

Enfin, les CEPM ont été identifiées comme cibles clés dans les infections pulmonaires, notamment lors de la pandémie COVID-19, où une inflammation endothéliale (endothélite) pulmonaire a été mise en évidence, contribuant à la dysfonction vasculaire et à la formation de microthrombus (Ackermann et al., 2024).

L'ensemble de ces éléments place les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires au centre des processus adaptatifs et pathologiques pulmonaires, y compris dans les mécanismes de réparation, de perméabilité vasculaire, et d'angiogenèse.

4. Perméabilité et résistance électrique

L'une des fonctions les plus fondamentales de l'endothélium est le contrôle de la perméabilité vasculaire. Cette fonction repose principalement sur l'intégrité des jonctions intercellulaires et sur la capacité des cellules endothéliales à réguler activement l'entrée ou la sortie de fluides, de solutés, voire de cellules immunitaires entre le compartiment vasculaire et les tissus périphériques.

Trois types de jonctions intercellulaires participent à la régulation de cette barrière :

- **Les jonctions serrées (tight junctions)**, constituées de protéines transmembranaires comme les claudines, les occludines et les JAM (junctional adhesion molecules), associées à des protéines cytoplasmiques telles que ZO-1, ZO-2 et ZO-3. Ces jonctions limitent la diffusion paracellulaire des ions et des molécules hydrosolubles.
- **Les jonctions adhérentes**, dont la plus étudiée est la VE-cadhérine. Elle forme des complexes avec les caténines (α, β, p120), permettant l'ancrage au cytosquelette d'actine et la modulation dynamique des contacts intercellulaires.
- **Les jonctions communicantes (gap junctions)**, composées de connexines (notamment connexine-43), permettent le passage de signaux ioniques et métaboliques entre cellules voisines.

La **résistance électrique transendothéliale (TEER)** est une mesure fonctionnelle couramment utilisée en recherche pour évaluer l'intégrité de la barrière endothéliale in vitro. Des valeurs élevées de TEER, comme observées dans la barrière hémato-encéphalique, traduisent une perméabilité réduite, tandis que des valeurs faibles, comme dans l'endothélium hépatique ou splénique, indiquent une perméabilité plus importante (Helms et al., 2016).

Chez les HPMEC, la TEER est modérément élevée, reflétant l'équilibre délicat entre la nécessité d'une barrière efficace contre les agents pathogènes inhalés et la nécessité de permettre les échanges gazeux.

En condition pathologique, comme lors d'une infection ou d'un stress inflammatoire (ex. TNF-α, IL-1β), la perméabilité augmente via la phosphorylation de la VE-cadhérine, la dissociation des complexes de jonctions et la réorganisation du cytosquelette (Huveneers et al., 2012).

La signalisation intracellulaire impliquée dans cette régulation fait intervenir de nombreuses voies :

- La voie RhoA/ROCK module la contractilité cellulaire via la myosine light chain kinase (MLCK), ce qui entraîne une ouverture des jonctions.
- La voie Rac1 favorise au contraire le renforcement des contacts intercellulaires en stabilisant la VE-cadhérine.
- Le calcium intracellulaire joue un rôle clé dans l'activation des phosphatases et kinases impliquées dans la perméabilité (Komarova & Malik, 2010).

La capacité de l'endothélium à moduler dynamiquement sa perméabilité est essentielle non seulement dans les processus physiologiques comme la migration leucocytaire ou l'homéostasie tissulaire, mais aussi dans les pathologies telles que l'œdème pulmonaire, le choc septique, ou encore les syndromes vasculaires fuyants (Gavard & Gutkind, 2008).

5. Signalisation intracellulaire

Les cellules endothéliales disposent d'un arsenal complexe de voies de signalisation leur permettant de répondre à une multitude de stimuli externes (mécaniques, inflammatoires, hypoxiques, métaboliques). Cette signalisation conditionne non seulement leur survie, leur phénotype, leur capacité migratoire et prolifération, mais aussi leur rôle dans la régulation vasculaire et immunitaire.

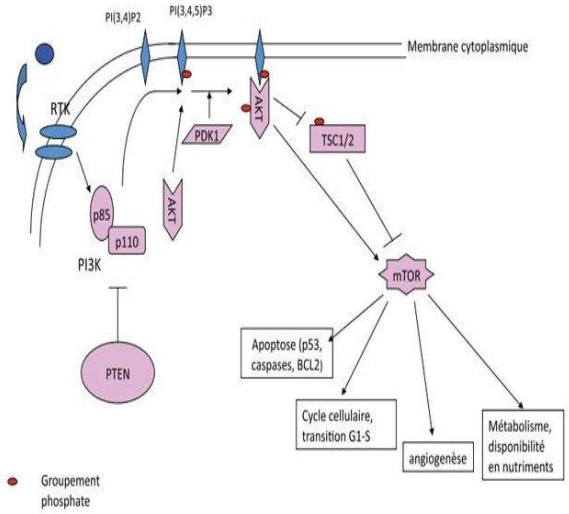


Figure 10 Voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR dans la régulation cellulaire endothéliale. *(Source Therkildsen et al., 2014)*

Parmi les principales voies activées dans les cellules endothéliales, on retrouve :

- **La voie PI3K/AKT** : elle est déclenchée par des ligands comme le VEGF, l'IGF-1 ou encore l'angiopoïétine-1(**Figure 10**). Elle active ensuite AKT, une sérine-thréonine kinase qui favorise la survie cellulaire, la production de NO via l'eNOS, et la protection contre l'apoptose (Fulton et al., 1999).
- **La voie MAPK/ERK** : activée par les récepteurs tyrosine kinase, elle est centrale dans la prolifération et la migration endothéliale (**Figure 7**).

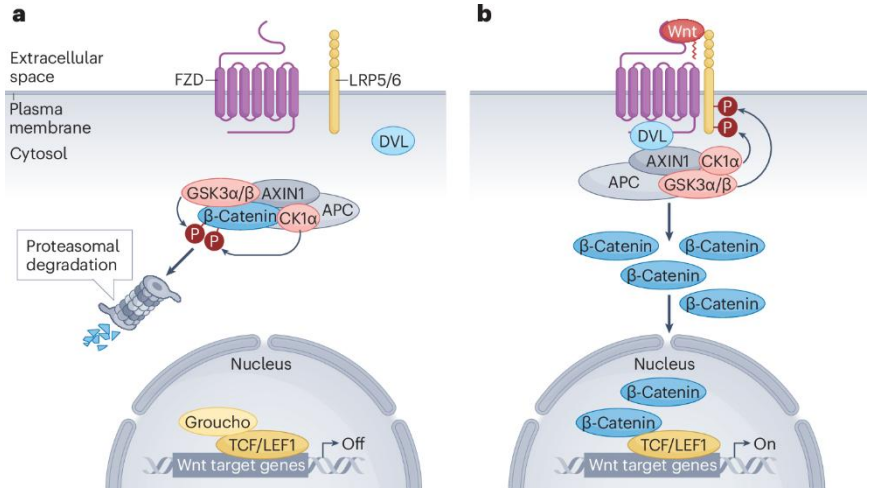


Figure 11: Régulation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine en absence (a) ou en présence (b) de ligand. *(Source:Maurice & Angers,2025)*

Elle implique une cascade Raf-MEK-ERK conduisant à la phosphorylation de facteurs de transcription nucléaires comme Elk-1, modulant la transcription de gènes pro-angiogéniques (Cong & Kong, 2020).

- **La voie PLCγ/DAG/IP3** : particulièrement importante dans la signalisation VEGF, elle provoque une augmentation du calcium intracellulaire via l'IP3, ce qui active des kinases comme PKC et stimule la libération de NO ou de prostacyclines.
- **La voie NF-κB** : centrale dans la réponse inflammatoire, elle est activée par les cytokines (TNF-α, IL-1β), le stress oxydatif ou les PAMPs (LPS). NF-κB transloque dans le noyau et induit l'expression de nombreuses molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1), de cytokines (IL-6, MCP-1) et de facteurs procoagulants (tissu factor) (**Figure 12**).

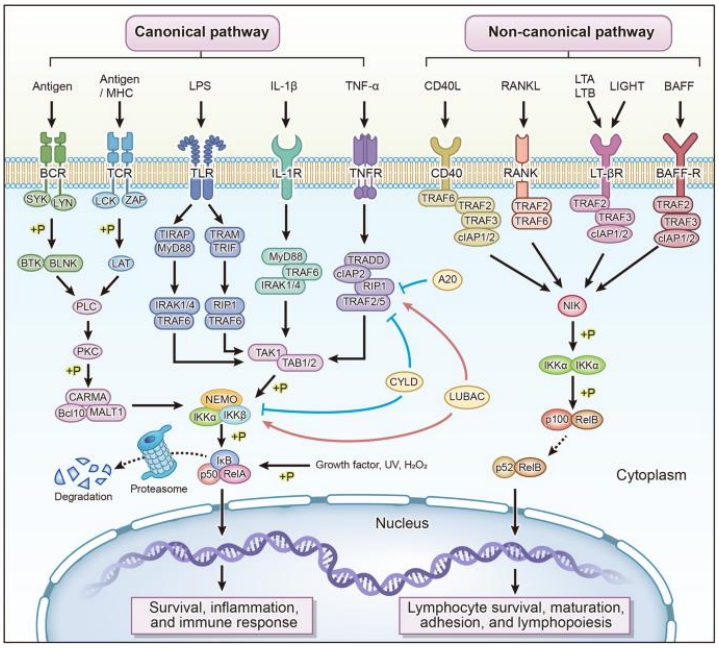


Figure 12: La voie NF-κB *(Guo et al,. 2024)*

- **Les voies Notch et Wnt/β-caténine** : elles sont impliquées dans la différenciation endothéliale et la spécialisation fonctionnelle des lits vasculaires (**Figure 11**). Notch, activé par Dll4, est essentiel à la sélection des cellules tip vs stalk lors de l'angiogenèse (Maurice & Angers, 2025).
- **Les canaux ioniques et le calcium** : le calcium intracellulaire, en particulier dans les microdomaines membranaires, régule la contractilité cellulaire, la perméabilité et la sécrétion. Le flux calcique est souvent initié par l'activation de TRP channels ou de récepteurs sensibles à l'étirement (Shear stress).

Cette diversité de signalisation permet une plasticité exceptionnelle de l'endothélium, capable de s'adapter finement à son environnement. En situation physiologique, ces voies permettent la régénération vasculaire, l'ajustement du débit sanguin ou la réponse aux signaux métaboliques. En pathologie, leur dérégulation est à l'origine de nombreux désordres : inflammation chronique, hyperperméabilité, défaut de réparation, ou encore néovascularisation anarchique.

6. Transmigration leucocytaire

La transmigration leucocytaire, également appelée diapédèse, est un processus fondamental de la réponse immunitaire au cours duquel les leucocytes quittent la circulation sanguine pour pénétrer dans les tissus. Ce passage transendothéliale est rigoureusement contrôlé par les

cellules endothéliales, qui orchestrent l'ensemble du processus à travers une série d'événements séquentiels dépendant de signaux inflammatoires.

Ce mécanisme se décompose en plusieurs étapes clés (**Figure 13**) :

1. **Capture et roulement** : sous l'effet de cytokines inflammatoires (TNF-α, IL-1β), les cellules endothéliales expriment des sélectines (E-sélectine, P-sélectine) qui permettent le roulement des leucocytes sur la paroi vasculaire.
2. **Activation** : les leucocytes au contact des chimiokines fixées à la surface endothéliale (comme CXCL8/IL-8 ou CCL2/MCP-1) activent leurs intégrines via des voies intracellulaires (G-protéines), augmentant leur affinité pour les molécules d'adhésion endothéliales.
3. **Adhésion ferme** : les intégrines leucocytaires (LFA-1, Mac-1) interagissent avec les immunoglobulines de la superfamille exprimées par l'endothélium (ICAM-1, VCAM-1), stabilisant l'adhésion au site d'extravasation.
4. **Diapédèse** : le leucocyte traverse l'endothélium soit par voie paracellulaire (entre les cellules), soit par voie transcellulaire (à travers une cellule endothéliale). Ce processus nécessite la réorganisation du cytosquelette endothélial, le relâchement temporaire des jonctions (VE-cadhérine) et l'implication de molécules telles que PECAM-1, CD99 et JAM-A (Muller, 2011; Zonneveld et al., 2014).
5. **Migration interstitielle** : une fois hors du vaisseau, les leucocytes poursuivent leur progression vers le foyer inflammatoire, guidés par les gradients chimiotactiques.

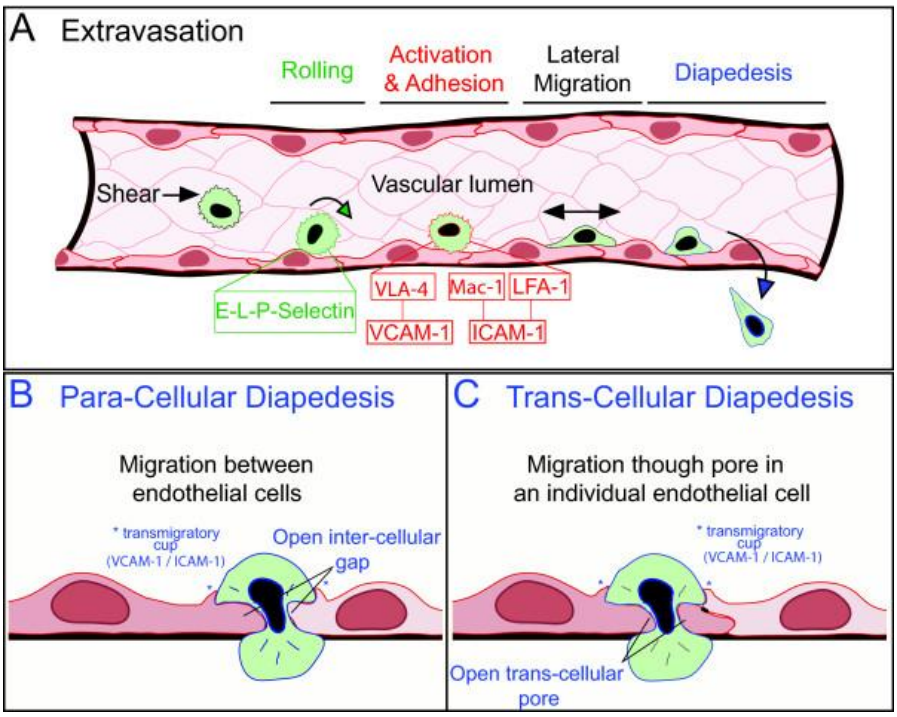


Figure 13: Cascade d'adhésion et d'extravasation leucocytaire *(Souce :Zonneveld et al., 2014)*

La transmigration est particulièrement active dans les veinules post-capillaires, où le débit sanguin est ralenti et la paroi vasculaire plus perméable. Les cellules endothéliales microvasculaires, notamment les HPMEC, sont particulièrement impliquées dans ces processus en contexte pulmonaire. Leur activation chronique, comme observée dans les maladies inflammatoires pulmonaires (ex. : mucoviscidose, bronchopneumopathie chronique obstructive), conduit à une perméabilité accrue, une expression prolongée de molécules d'adhésion et une infiltration massive des neutrophiles.

Cette capacité de l'endothélium à réguler finement la transmigration leucocytaire représente un levier thérapeutique important dans les pathologies inflammatoires chroniques, où une inhibition ciblée des interactions moléculaires peut atténuer les dommages tissulaires.

7. Maturation vasculaire

La maturation vasculaire est une étape critique de l'angiogenèse, qui permet de stabiliser les néovaisseaux formés lors de la phase de bourgeonnement angiogénique. Cette stabilisation implique plusieurs mécanismes intercellulaires et moléculaires, qui garantissent l'intégrité fonctionnelle et la durabilité du réseau vasculaire nouvellement établi.

Elle repose principalement sur l'interaction entre les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires, notamment :

- **Les péricytes**, qui entourent les capillaires et les veinules postcapillaires,
- **Les cellules musculaires lisses**, présentes dans les vaisseaux de plus gros calibre (artérioles et veines).

Ces cellules sont recrutées autour des cellules endothéliales par l'intermédiaire de signaux spécifiques. Le **PDGF-BB (platelet-derived growth factor-BB)**, sécrété par les cellules endothéliales, agit sur les récepteurs PDGFR-β exprimés par les péricytes, entraînant leur prolifération, migration et attachement au réseau vasculaire (Hellström et al., 2001).

Une fois recrutées, les cellules périvasculaires sécrètent à leur tour des facteurs stabilisants, tels que :

- **TGF-β (transforming growth factor-β)** : impliqué dans la maturation de la matrice extracellulaire (collagène IV, laminine) et dans la différenciation des cellules musculaires lisses,
- **Angiopoïétine-1 (Ang-1)** : qui, via son récepteur endothélial Tie2, induit la quiescence cellulaire, le renforcement des jonctions et la résistance au stress oxydatif (Korhonen et al., 2016).

Inversement, l'angiopoïétine-2 (Ang-2) (Erreur ! Source du renvoi introuvable.), exprimée lors des phases actives d'angiogenèse ou dans les contextes pathologiques, agit comme un antagoniste d'Ang-1 et favorise la déstabilisation des vaisseaux, préparant l'endothélium à une nouvelle activation.

La **maturation vasculaire** est également dépendante de la régulation de la perméabilité vasculaire **(**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**)**. Les péricytes régulent la réorganisation du cytosquelette endothélial et renforcent les jonctions intercellulaires. Une déficience en péricytes (observée dans certains modèles murins) conduit à des vaisseaux perméables, anormaux, favorisant par exemple la fuite de protéines plasmatiques et l'angiogenèse pathologique (Armulik et al., 2005).

Dans les tissus pulmonaires, les interactions entre les cellules endothéliales microvasculaires et les péricytes jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire. Des altérations de cette interaction sont impliquées dans des pathologies telles que la fibrose pulmonaire idiopathique ou l'hypertension pulmonaire.

Ainsi, la maturation vasculaire ne représente pas une simple étape terminale de l'angiogenèse, mais un processus dynamique, réversible, et finement régulé.

Elle conditionne la stabilité structurelle et fonctionnelle du réseau vasculaire, et constitue une cible thérapeutique dans de nombreuses pathologies vasculaires et tumorales.

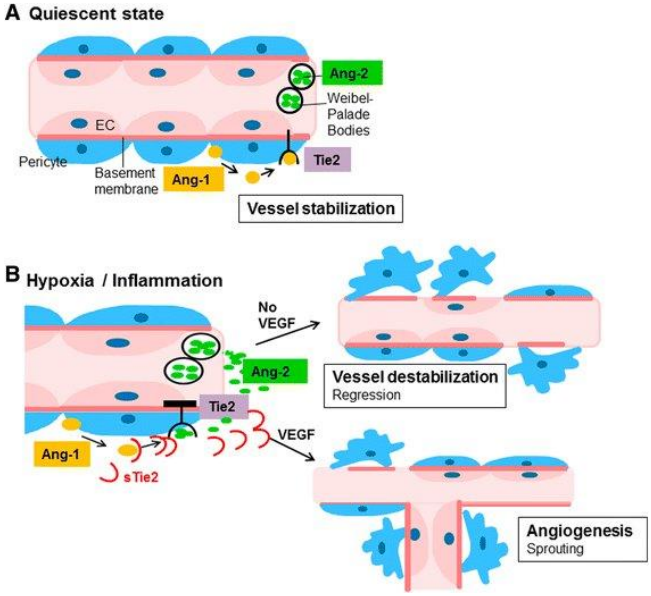


Figure 14: Rôle des angiopoïétines et du récepteur Tie2 dans la stabilité vasculaire. *(Moritz et al.,2017)*
En condition quiescente, Ang-1, produit par les péricytes, active le récepteur Tie2 des cellules endothéliales, assurant la stabilisation des vaisseaux. En contexte d'hypoxie ou d'inflammation, les cellules endothéliales libèrent Ang-2, qui entre en compétition avec Ang-1 et inhibe Tie2, entraînant la déstabilisation vasculaire (perte des péricytes, régression des vaisseaux). En présence de VEGF, Ang-2 devient pro-angiogénique (prolifération, bourgeonnement). Le Tie2 soluble (sTie2), généré par clivage sous VEGF, piège Ang-1 et Ang-2, inhibant la signalisation Tie2 et limitant l'angiogenèse.

8. Plasticité phénotypique

La plasticité phénotypique désigne la capacité des cellules endothéliales à modifier leur comportement, leur structure et leur profil d'expression génique en réponse aux stimuli de leur environnement. Cette capacité d'adaptation est essentielle à la diversité fonctionnelle de l'endothélium, qui doit répondre à des besoins variables selon les organes, les conditions physiologiques ou les contextes pathologiques.

La plasticité endothéliale se manifeste dans plusieurs dimensions :

a. Réponse au flux sanguin (shear stress)

Le flux laminaire exerce un stress de cisaillement sur les cellules endothéliales, qui y répondent en modifiant leur orientation, leur phénotype transcriptionnel (via les facteurs KLF2, KLF4), et en adoptant un profil anti-inflammatoire et antithrombotique. À l'inverse, un flux turbulent ou oscillant, observé dans les bifurcations artérielles, favorise l'activation de NF-κB et l'expression de molécules pro-inflammatoires (e.g., VCAM-1, ICAM-1(Hahn & Schwartz, 2009).

b. Adaptation à l'hypoxie

Sous faible pression partielle d'oxygène, les cellules endothéliales stabilisent HIF-1α, qui active la transcription de gènes impliqués dans l'angiogenèse (VEGF, ANGPT2), le métabolisme glycolytique et la survie cellulaire. Cette réponse est essentielle dans les tissus ischémiques et dans les microenvironnements tumoraux (Semenza, 2012) .

c. Activation inflammatoire

En présence de cytokines comme TNF-α, IL-1β ou LPS, les cellules endothéliales acquièrent un phénotype pro-inflammatoire : elles augmentent la perméabilité vasculaire, expriment des molécules d'adhésion (E-sélectine, VCAM-1), produisent des chimiokines (MCP-1, IL-8) et participent activement au recrutement des leucocytes. Cette activation peut être transitoire ou chronique selon la nature du stimulus (Dri et al., 2023).

d. Transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT)

Dans certains contextes pathologiques, comme la fibrose, l'hypertension pulmonaire ou le cancer, les cellules endothéliales peuvent subir une transition vers un phénotype mésenchymateux (EndoMT), caractérisé par la perte des marqueurs endothéliaux (VE-cadhérine, CD31) et l'acquisition de marqueurs mésenchymateux (α-SMA, vimentine, fibronectine). Ce processus contribue à la fibrose tissulaire et au remodelage pathologique (Piera-Velazquez et al., 2011).

e. Influence du microenvironnement :

Les interactions avec la matrice extracellulaire (via les intégrines), les cellules adjacentes (péricytes, cellules musculaires lisses, cellules immunitaires) et les signaux métaboliques (glucose, lipides, acides gras) participent à la modulation phénotypique de l'endothélium. Cette sensibilité contextuelle explique les variations de réponses observées entre les différents lits vasculaires.

La plasticité endothéliale permet donc d'adapter finement les fonctions vasculaires aux besoins spécifiques des tissus. Cependant, lorsqu'elle est déréglée, elle devient un facteur clé de progression des maladies chroniques : inflammation persistante, néoangiogenèse pathologique, perte de fonction barrière, thrombose, etc.

9. Endothélium et pathologies

L'endothélium, par sa position stratégique et ses nombreuses fonctions, joue un rôle clé dans de nombreuses pathologies. Son activation ou sa dysfonction est souvent un événement précoce et déterminant dans l'évolution de maladies cardiovasculaires, métaboliques, respiratoires, auto-immunes ou infectieuses (**Tableau 3**; **Figure 15**).

a. Dysfonction endothéliale : La dysfonction endothéliale se caractérise par une altération de la production de NO, une hyperperméabilité vasculaire, une expression excessive de molécules d'adhésion et une activation pro-inflammatoire. Ce phénotype est observé dans l'hypertension, le diabète, l'athérosclérose, et les syndromes de fuite capillaire.

- Dans l'**athérosclérose**, les zones de flux perturbé favorisent l'activation chronique de l'endothélium, le recrutement de monocytes, la formation de cellules spumeuses et le dépôt lipidique, contribuant à la formation de plaques (Libby et al., 2002).
- Dans le **diabète**, l'hyperglycémie chronique induit un stress oxydatif, altère la biodisponibilité du NO, et active la voie AGE-RAGE, favorisant l'inflammation et la thrombose.
- Dans l'**hypertension**, une diminution de l'activité de l'eNOS et une sensibilité accrue à l'endothéline-1 contribuent à la vasoconstriction chronique.

b. Maladies inflammatoires chroniques : L'endothélium est un acteur central dans la genèse et l'entretien de l'inflammation chronique. Son activation persistante favorise la transmigration leucocytaire, la production de cytokines et la perméabilisation vasculaire.

- Dans la **polyarthrite rhumatoïde** ou la **maladie de Crohn**, l'endothélium intestinal ou articulaire présente un profil activé chronique, facilitant l'infiltration des lymphocytes T et monocytes.
- Dans la **mucoviscidose**, l'endothélium pulmonaire subit une activation prolongée, avec une altération de la barrière vasculaire, une réponse accrue aux stimuli inflammatoires, et une participation à la fibrose pulmonaire (Noe et al., 2009; Rodriguez-Miguelez et al., 2016).

c. Maladies infectieuses : L'endothélium est une cible directe ou indirecte d'agents pathogènes.

- Dans les infections virales comme le **COVID-19**, le SARS-CoV-2 infecte directement les cellules endothéliales via le récepteur ACE2, provoquant une endothélite diffuse et une coagulopathie associée (Varga et al., 2020).

- Dans les **septicémies bactériennes**, le LPS des bactéries Gram-négatives induit une hyperperméabilité, une expression massive de molécules pro-inflammatoires et une chute de la résistance vasculaire systémique.

d. Pathologies vasculaires pulmonaires : Dans des maladies comme le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), l'hypertension pulmonaire ou l'embolie pulmonaire, l'endothélium pulmonaire joue un rôle central dans le remodelage vasculaire, la perméabilité accrue et la réponse inflammatoire.

Les HPMEC, dans ces contextes, présentent une activation prolongée, une production accrue de VEGF, d'IL-6 et de MCP-1, ainsi qu'une altération des jonctions intercellulaires.

e. Rôle dans la tumorigenèse : L'endothélium tumoral présente un phénotype distinct : perméabilité accrue, expression de récepteurs pro-angiogéniques, réponse altérée à l'oxygène. Il facilite l'angiogenèse tumorale, le recrutement des cellules immunosuppressives, et la dissémination métastatique (Hanahan & Weinberg, 2011).

Ainsi, l'endothélium ne constitue pas seulement un témoin des pathologies, mais un acteur actif de leur progression

Tableau 3 Endothélium sain vs endothélium dysfonctionnel

Propriété	Endothélium sain	Endothélium activé/dysfonctionnel
NO	Haute production	Réduite
Perméabilité	Contrôlée	Augmentée
Molécules d'adhésion	Faible expression	Surexprimées (VCAM-1, ICAM-1)
Inflammation	Anti-inflammatoire (KLF2)	Pro-inflammatoire (NF-κB)
État	Quiescent	Activé, perméable, procoagulant

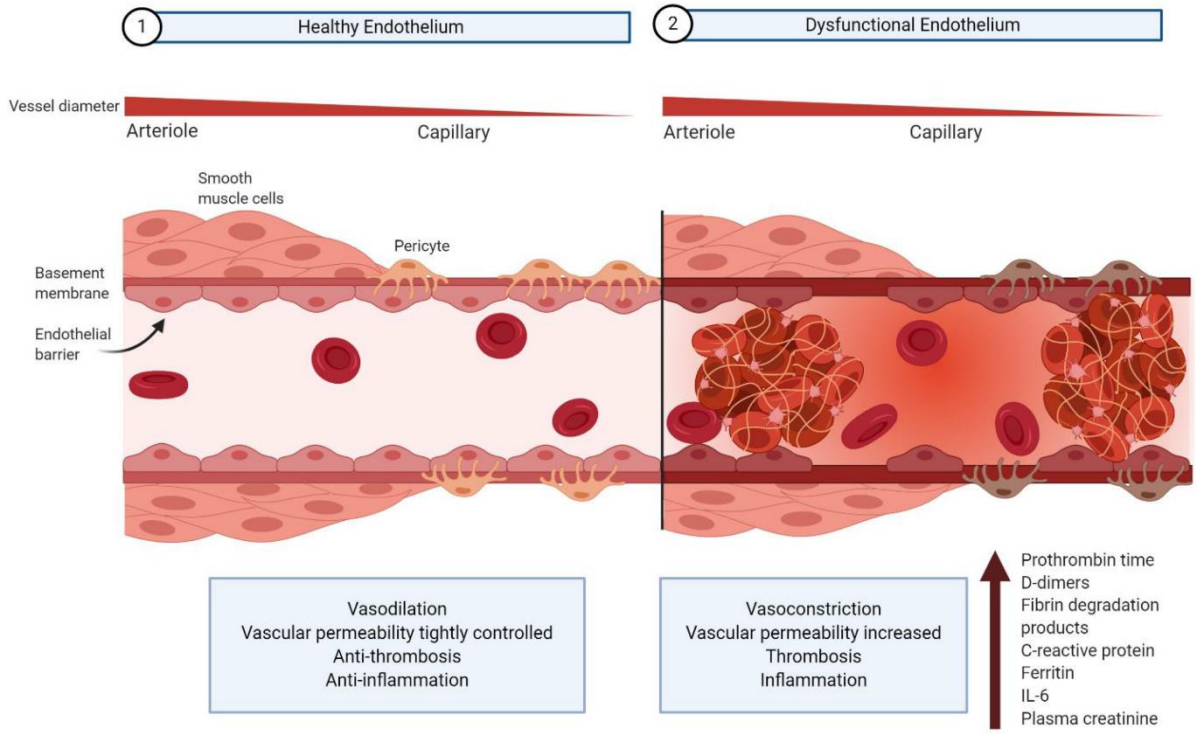


Figure 15 Architecture de l'endothélium vasculaire sain et dysfonctionnel *(source : Bernard et al.2020).*
(1) En conditions normales, l'endothélium forme une monocouche fine située entre le sang et les tissus. Dans les artérioles, il repose sur une membrane basale séparant les cellules endothéliales des cellules musculaires lisses, qui régulent le tonus vasculaire. Dans les capillaires, la paroi est réduite à l'endothélium, la membrane basale et les péricytes, qui assurent avec les cellules endothéliales une perméabilité contrôlée, un état anti-thrombotique et une réponse anti-inflammatoire. (2) En cas de dysfonction, cette barrière est altérée : vasoconstriction excessive, fuite vasculaire, thrombose et inflammation sont favorisées. Ces altérations peuvent être suivies via différents biomarqueurs endothéliaux.

Ces différents niveaux de régulation mettent en lumière la sensibilité de l'endothélium aux médiateurs extérieurs. Parmi eux, les prokinéticines émergent comme des facteurs potentiels participants à la régulation des fonctions endothéliales. Le chapitre suivant leur sera consacré.

Chapitre 3 : Les prokinéticines

Ce chapitre s'inscrit dans la continuité des deux précédents, consacrés à l'inflammation, à l'angiogenèse et les cellules endothéliales. Dans ce chapitre, nous allons explorer comment la famille des prokinéticines s'inscrit fonctionnellement au croisement de l'inflammation et de l'angiogenèse, en préfigurant leur rôle central dans des pathologies pulmonaires comme la mucoviscidose, abordée au chapitre suivant. Les prokinéticines sont une famille peptidique émergente, dont les membres interviennent dans plusieurs processus biologiques (Zhou, 2006). Ils constituent une famille de petites protéines (ou peptides) naturellement présentes dans l'organisme. Découvertes au début des années 2000, elles suscitent un intérêt croissant en raison de leurs fonctions multiples dans divers processus biologiques. Parmi ceux-ci, deux mécanismes fondamentaux sont particulièrement concernés : l'inflammation et l'angiogenèse (la formation de nouveaux vaisseaux sanguins). Ce rôle double, médiateur inflammatoire et acteur angiogénique, confère aux prokinéticines une position stratégique dans la compréhension des maladies multifactorielles, notamment pulmonaires, comme la mucoviscidose.

Ces peptides agissent en se liant à des récepteurs spécifiques situés à la surface de certaines cellules, notamment les cellules endothéliales humaines, qui tapissent l'intérieur des vaisseaux. Cette interaction déclenche des réponses cellulaires variées, telles que la prolifération, la migration ou encore l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Zhou, 2006).

Comprendre le rôle des prokinéticines dans ces processus permet non seulement de mieux appréhender certains mécanismes pathologiques, mais aussi d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques dans des contextes où inflammation et angiogenèse sont étroitement liées, comme dans les maladies cardiovasculaires, les cancers ou les pathologies inflammatoires chroniques.

1. Découverte de la famille des prokinéticines

Découverte en 1972, suite à des travaux sur le venin du serpent mamba noir effectués par Daniël J. STRYDOM et François J. JOUBERT (Joubert & Strydom, 1980). Ce serpent, aussi connu sous le nom de *Dendroaspis polylepis*, possède un venin extrêmement dangereux. Celui-ci a été purifié et séquencé pour déterminer sa composition. Parmi les composants identifiés figure une protéine non toxique nommée protéine A du venin de mamba noir (VPRA), découverte et caractérisée en 1980.

Plusieurs années plus tard, des recherches sur cette protéine ont démontré qu'elle induisait des contractions au niveau de l'iléon (partie terminale de l'intestin grêle), ce qui a conduit à sa reclassification en Mamba Intestinal Toxin 1 (MIT-1) (Schweitz et al., 1999).

Cette activité contractile laisse supposer une interaction directe avec des récepteurs membranaires présents sur les muscles lisses intestinaux (Li et al., 2001a).

À la même époque, une autre protéine a été retrouvée sur la peau du crapaud à ventre jaune (*Bombina variegata*) (Negri et al., 2004). Cette molécule, de poids moléculaire 8 kDa, a été baptisée Bv8. Il a été montré que Bv8 et MIT-1 possèdent des similarités structurelles (notamment la présence de dix résidus cystéines conservés et une séquence N-terminale AVITGA), ainsi que fonctionnelles, notamment leur capacité à induire des contractions intestinales.

Ces observations ont mené à l'hypothèse de l'existence d'une nouvelle famille de peptides bioactifs conservée au cours de l'évolution. Ces observations issues du règne animal ont rapidement conduit à la recherche de protéines homologues humaines, dans l'objectif d'identifier des médiateurs similaires intervenant dans les processus physiopathologiques chez l'homme. Des homologues ont par la suite été retrouvés chez la souris, renforçant la validité de cette hypothèse (Wechselberger et al., 1999; Cheng et al., 2006).

2. Identification des prokinéticines humaines

En 2001, deux équipes indépendantes ont identifié les analogues humains de cette nouvelle famille :

- L'équipe de Zhou, via une approche bioinformatique, a comparé les séquences de MIT-1 et de Bv8 avec le génome humain. Cela a permis d'identifier deux gènes codant pour des protéines matures de 86 et 81 acides aminés. Ces deux peptides, partageant 44 % d'identité, ont été nommés prokinéticine 1 (PROK1) et prokinéticine 2 (PROK2). L'identification de ces ligands a logiquement orienté les recherches vers leurs récepteurs spécifiques, nécessaires à la transmission des signaux biologiques. Ils présentent tous deux des effets contractiles sur le tube digestif, probablement via l'activation de récepteurs exprimés dans les muscles lisses intestinaux (Li et al., 2001a).
- En parallèle, l'équipe de Ferrara a identifié, à partir d'une peptidothèque, un facteur de croissance de 86 acides aminés stimulant la prolifération, la migration et la fenestration des cellules endothéliales. Ce facteur n'agit cependant que sur certains types d'endothélium, contrairement au VEGF classique (LeCouter et al., 2001; Brouillet et al., 2010). Il a été

nommé EG-VEGF (Endocrine Gland Derived-Vascular Endothelial Growth Factor), en raison de son expression préférentielle dans des tissus endocrines (comme la surrénale, l'ovaire ou le placenta).

En 2002, il a été démontré que PROK1 et EG-VEGF sont en réalité la même protéine. Ces découvertes ont permis d'établir que les prokinéticines humaines forment une famille de peptides pléiotropes, jouant un rôle à la fois dans la motilité digestive et dans l'angiogenèse tissulaire spécifique (LeCouter et al., 2001; Li et al., 2001a).

3. Découverte des récepteurs : PROKR1 et PROKR2

Ce n'est qu'après la mise en évidence des ligands PROK1 et PROK2 que leurs récepteurs spécifiques ont été identifiés. Une première observation, issue d'une expérience fonctionnelle en 2001, a montré que l'ajout de GTPγS (forme non hydrolysable du GTP) inhibait les effets contractiles de PROK1 sur le tube digestif. Cela suggérait que les prokinéticines agissent via des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), une classe de récepteurs membranaires très répandus dans les systèmes biologiques (Lin et al., 2002a).

En 2002, trois équipes ont découvert les deux récepteurs des prokinéticines, en utilisant des approches complémentaires :

- ***Approche génomique descendante :*** cette méthode consiste à chercher dans le génome humain des gènes codant pour des RCPGs, en particulier ceux homologues à des récepteurs connus chez la souris. Deux séquences, ZAQ (homologue de GPR73) et E15, ont attiré l'attention. Ces deux gènes, retrouvés sur les chromosomes 2 et 20, codent pour deux récepteurs orphelins présentant 85 % d'homologie. Une fois exprimés *in vitro,* il a été montré qu'ils sont activés respectivement par PROK1 et PROK2. Ces récepteurs ont été nommés PROKR1 et PROKR2 (Masuda et al., 2002; Soga et al., 2002) .
- ***Approche fonctionnelle ascendante :*** une autre équipe a sélectionné une série de RCPGs orphelins et les a testés contre différents ligands jusqu'à identifier ceux qui répondaient spécifiquement à PROK1 et PROK2 (Lin et al., 2002a).

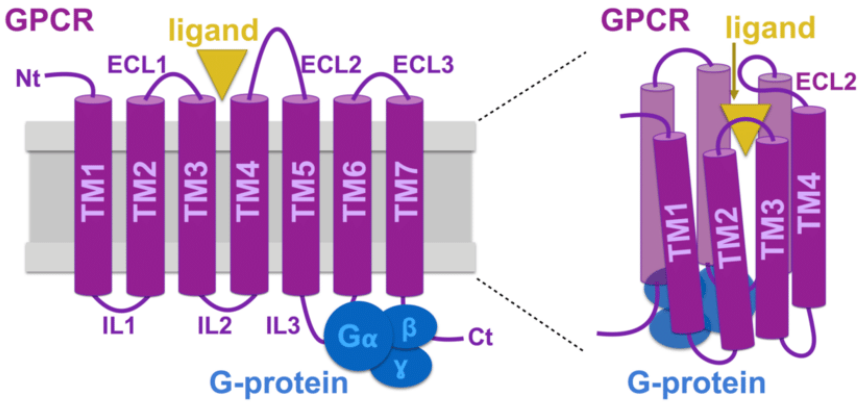


Figure 16 Représentation simplifiée de la structure des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)*. (Source : Schneider et al., 2018).*
Ces récepteurs sont constitués de sept hélices alpha transmembranaires (TM1 à TM7), connectées par trois boucles intracellulaires (IL1 à IL3) et trois boucles extracellulaires (ECL1 à ECL3). À leurs extrémités, on trouve un domaine N-terminal situé à l'extérieur de la cellule et un domaine C-terminal localisé dans le cytoplasme. L'ensemble de la structure tertiaire crée une cavité, qui constitue le site de liaison des ligands

Ces résultats ont confirmé que les prokinéticines agissent via PROKR1 et PROKR2, deux récepteurs de type RCPG (**Figure 16**), exprimés de manière différente selon les tissus et les fonctions physiologiques ciblées. L'identification de PROKR1 et PROKR2 comme récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) a permis de caractériser avec précision les voies de signalisation qu'ils activent, ouvrant la voie à une meilleure compréhension de leur rôle dans les processus d'inflammation et d'angiogenèse. Étant donné que leurs récepteurs appartiennent à la famille des RCPG, il convient de s'intéresser aux voies de signalisation dépendantes des protéines G.

3.1. Voie de signalisation dépendante des protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) doivent leur nom à leur capacité à interagir avec des protéines G hétérotrimériques, qui constituent leurs principaux effecteurs intracellulaires (Rosenbaum et al., 2009). Cette interaction constitue une étape centrale dans la transduction du signal extracellulaire vers une réponse cellulaire.

3.1.1. Structure des protéines G

Les protéines G sont dites *hétérotrimériques* car elles sont composées de trois sous-unités :

- Gα (alpha)
- Gβ (bêta)
- Gγ (gamma)

À l'état basal (inactif), la sous-unité Gα est liée à une molécule de GDP (guanosine diphosphate) et forme un complexe stable avec le dimère Gβγ.

3.1.2. Activation des RCPG

Lorsque qu'un ligand extracellulaire (hormone, neurotransmetteur, etc.) se lie à un RCPG, ce dernier subit un changement de conformation qui augmente son affinité pour la protéine G intracellulaire (Hilger et al., 2018).

Le récepteur activé agit alors comme un facteur d'échange de nucléotides guanyliques (GEF), en catalysant le remplacement du GDP par un GTP (guanosine triphosphate) sur la sous-unité Gα (Calebiro et al., 2021). Ce changement déclenche une dissociation du complexe :

- La sous-unité Gα-GTP
- Le dimère Gβγ

Chacun de ces composants est alors capable d'activer des effecteurs spécifiques en aval, initiant ainsi diverses cascades de signalisation intracellulaire.

3.1.2.1. Voies effectrices activées

Les protéines G activées peuvent induire plusieurs réponses en fonction du type de sous-unité Gα impliquée (Gαs, Gαi, Gαq, Gα12/13) (**Figure 17**) :

- Gαs → activation de l'adénylate cyclase (AC) → production d'AMPc → activation de la protéine kinase A (PKA)
- Gαq → activation de la phospholipase C-β (PLCβ) → production d'IP3 et de DAG → libération de calcium intracellulaire et activation de la PKC
- Gβγ peut également activer certains effecteurs, comme les canaux ioniques, la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) ou certaines MAP kinases (Khan et al., 2013; Pedro et al., 2020)

3.1.2.2. Désactivation du signal

La signalisation prend fin lorsque la sous-unité Gα hydrolyse le GTP en GDP grâce à son activité intrinsèque GTPasique. Ce retour à l'état inactif permet la réassociation du complexe hétérotrimérique Gα-GDP + Gβγ, prêt pour un nouveau cycle d'activation (Calebiro et al., 2021; Hilger et al., 2018).

3.2. Voie de signalisation dépendante de la β-arrestine

En plus des protéines G, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) peuvent également signaler via une autre famille d'effecteurs intracellulaires : les β-arrestines. Initialement identifiées comme des médiateurs de désensibilisation des RCPG, les β-arrestines jouent aussi un rôle actif dans la transduction de signaux indépendants des protéines G (**Figure 17**).

3.2.1. Famille des arrestines

La famille des arrestines se divise en deux grands groupes fonctionnels (Hilger et al., 2018):

- Arrestines visuelles : arrestine-1 (ARRB1) et arrestine-4 (ARRB4), exprimées dans les cellules photoréceptrices de la rétine.
- β-arrestines non visuelles : arrestine-2 (β-arrestine 1) et arrestine-3 (β-arrestine 2), ubiquitaires et impliquées dans la régulation des RCPG dans la plupart des tissus.

3.2.2. Recrutement de la β-arrestine

Lorsqu'un RCPG est activé par son ligand, son extrémité C-terminale (ou parfois les boucles intracellulaires) est phosphorylée par des kinases spécifiques appelées GRK (G protein-coupled receptor kinases). Cette phosphorylation crée des sites de liaison pour les β-arrestines (**Figure 17**).

Une fois recrutée, la β-arrestine se lie au RCPG activé, ce qui a plusieurs conséquences fonctionnelles :

- Découplage du récepteur et de la protéine G → arrêt de la signalisation G-dépendante (Hilger et al., 2018)
- Désensibilisation du récepteur, empêchant une activation prolongée ou excessive
- Internalisation du récepteur via le recrutement des protéines de la machinerie endocytaire, comme la clathrine et l'adaptine (Pierce & Lefkowitz, 2001; Srivastava et al., 2015).

Ce mécanisme protège la cellule d'une stimulation excessive, tout en préparant le récepteur à une internalisation ou un recyclage.

3.2 .3. Signalisation G-indépendante

Au-delà de leur rôle dans l'arrêt du signal G-dépendant, les β-arrestines sont également capables de transduire des signaux de manière autonome, en agissant comme des échafaudages (scaffold) pour plusieurs voies de signalisation intracellulaire. Par exemple, elles peuvent :

- Activer des MAP kinases (comme ERK1/2) indépendamment de l'activation des protéines G (Luttrell et al., 2001).
- Participer à des fonctions spécifiques dans certaines cellules (ex. : migration, différenciation, inflammation)

Cette double fonction, désensibilisation d'un côté, signalisation alternative de l'autre, positionne les β-arrestines comme des régulateurs clés de la plasticité fonctionnelle des RCPG. Ces mécanismes de signalisation expliquent pourquoi les prokinéticines sont impliquées dans plusieurs fonctions critiques dans différents tissus, incluant le tissu pulmonaire (Chauvet et al., 2015).

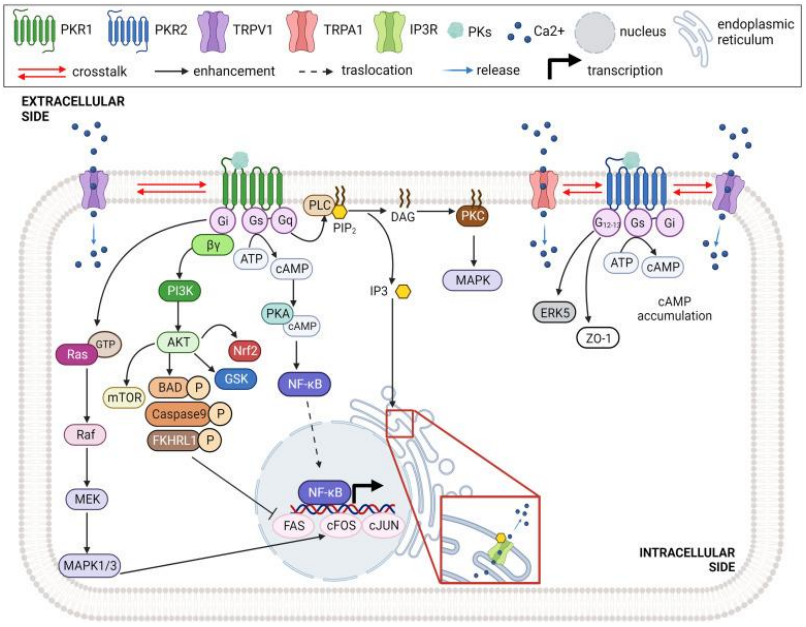


Figure 17 Voie de signalisation intracellulaire déclenchée par la liaison PROK/PROKR *(Source : Vincenzi et al., 2023)*
PKR1 exerce son activité biologique en activant les voies de signalisation Gi, Gs et Gq, tandis que PKR2 utilise les voies G12/13, Gs et Gi, en fonction du type cellulaire,

3.3. Rôle des RCPG dans les pathologies pulmonaires

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) jouent un rôle central dans la régulation de nombreuses fonctions pulmonaires. Leur implication dans des processus pathologiques chroniques ou aigus fait des RCPG des cibles thérapeutiques majeures dans les maladies respiratoires.

3.3.1. RCPG et remodelage pulmonaire

Les RCPG interviennent dans les mécanismes de remodelage pulmonaire, un processus complexe caractérisé par des modifications structurelles du tissu pulmonaire.

Ce remodelage est souvent observé dans des pathologies chroniques telles que l'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou l'hypertension artérielle pulmonaire. Il peut résulter de plusieurs phénomènes biologiques interconnectés :

- Inflammation persistante
- Fibrose (accumulation excessive de matrice extracellulaire)
- Vasoconstriction des artères pulmonaires

L'activation inappropriée ou prolongée de certains RCPG peut amplifier ces processus en favorisant la production de cytokines pro-inflammatoires, la prolifération cellulaire, ou encore la contractilité des cellules musculaires lisses (Nayak, Deshpande, & Penn, 2018).

3.3.1. Exemple : β2-adrénergique (β2AR)

Le récepteur β2-adrénergique (β2AR) est l'un des RCPG les plus étudiés dans les maladies respiratoires. Il joue un rôle essentiel dans plusieurs fonctions pulmonaires (Yang et al., 2021):

- Bronchodilatation : en activant l'adénylate cyclase via Gαs, le β2AR augmente les niveaux d'AMPc, ce qui induit une relaxation des muscles lisses bronchiques.
- Clairance mucociliaire : le β2AR stimule l'activité ciliaire, facilitant l'élimination du mucus et des particules inhalées.
- Modulation de l'inflammation : il régule négativement la libération de médiateurs inflammatoires par certaines cellules immunitaires, contribuant ainsi à un effet anti-inflammatoire local

Cependant, une stimulation chronique ou excessive du β2AR peut entraîner une désensibilisation du récepteur par recrutement de β-arrestines, réduisant son efficacité thérapeutique dans les traitements de l'asthme, comme les bêta-2 agonistes inhalés.

3.3.2. RCPG et inflammation pulmonaire

Plusieurs autres RCPG sont impliqués dans la régulation de l'inflammation pulmonaire, que ce soit dans les voies respiratoires ou le parenchyme :

- Les récepteurs des chimiokines (comme CCR2 ou CXCR3) favorisent le recrutement de cellules immunitaires.
- Le récepteur PAR-1, activé par la thrombine, contribue à la perméabilité vasculaire et à la réponse inflammatoire.
- Certains récepteurs orphelins (GPRs) sont également étudiés pour leur rôle potentiel dans la fibrose ou l'angiogenèse pulmonaire.
-

3.4. Nomenclature standardisée pour les prokinéticines

Du fait de l'existence de multiples appellations initiales (MIT-1, Bv8, EG-VEGF), une nomenclature normalisée a été adoptée pour éviter les confusions :

- PROK1 et PROK2 pour les deux ligands humains,
- PROKR1 et PROKR2 pour leurs récepteurs spécifiques.

Cette standardisation met en évidence l'unicité fonctionnelle de cette famille moléculaire, dont les effets s'étendent de la motilité digestive à la signalisation angiogénique, en passant par des rôles dans le système nerveux central et la reproduction (Ngan & Tam, 2008). Pour comprendre comment ces interactions ligand-récepteur sont possibles, il est important de s'attarder sur la structure des prokinéticines et de leurs récepteurs, ainsi que sur leur spécificité fonctionnelle.

4.Structure et activation des prokinéticines

Chez l'humain, PROK1 est localisé sur le chromosome 1p13.1 (**Figure 18**A), et PROK2 sur le chromosome 3p21.1, avec plusieurs isoformes, notamment PROK2L (L pour long) et PROK2β (**Figure 18**B). Les deux peptides partagent une séquence N-terminale commune, "AVITGA" (**Figure 18**C,D), indispensable à leur activité biologique, et présentent une structure stabilisée par 10 cystéines formant cinq ponts disulfures, assurant la rigidité nécessaire à leur reconnaissance par les récepteurs (Kaser et al., 2003; Vincenzi et al., 2023).

Récepteurs PROKR1 et PROKR2

Les deux récepteurs, PROKR1 et PROKR2, appartiennent à la classe A des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ils sont codés sur les chromosomes 2p13 pour PROKR1 et 20p13 pour PROKR2 (Lin et al., 2002a; Masuda et al., 2002). Ces récepteurs subissent des modifications post-traductionnelles, notamment la N-glycosylation, nécessaire à leur repliement, adressage membranaire et stabilité fonctionnelle (Patwardhan et al., 2021).

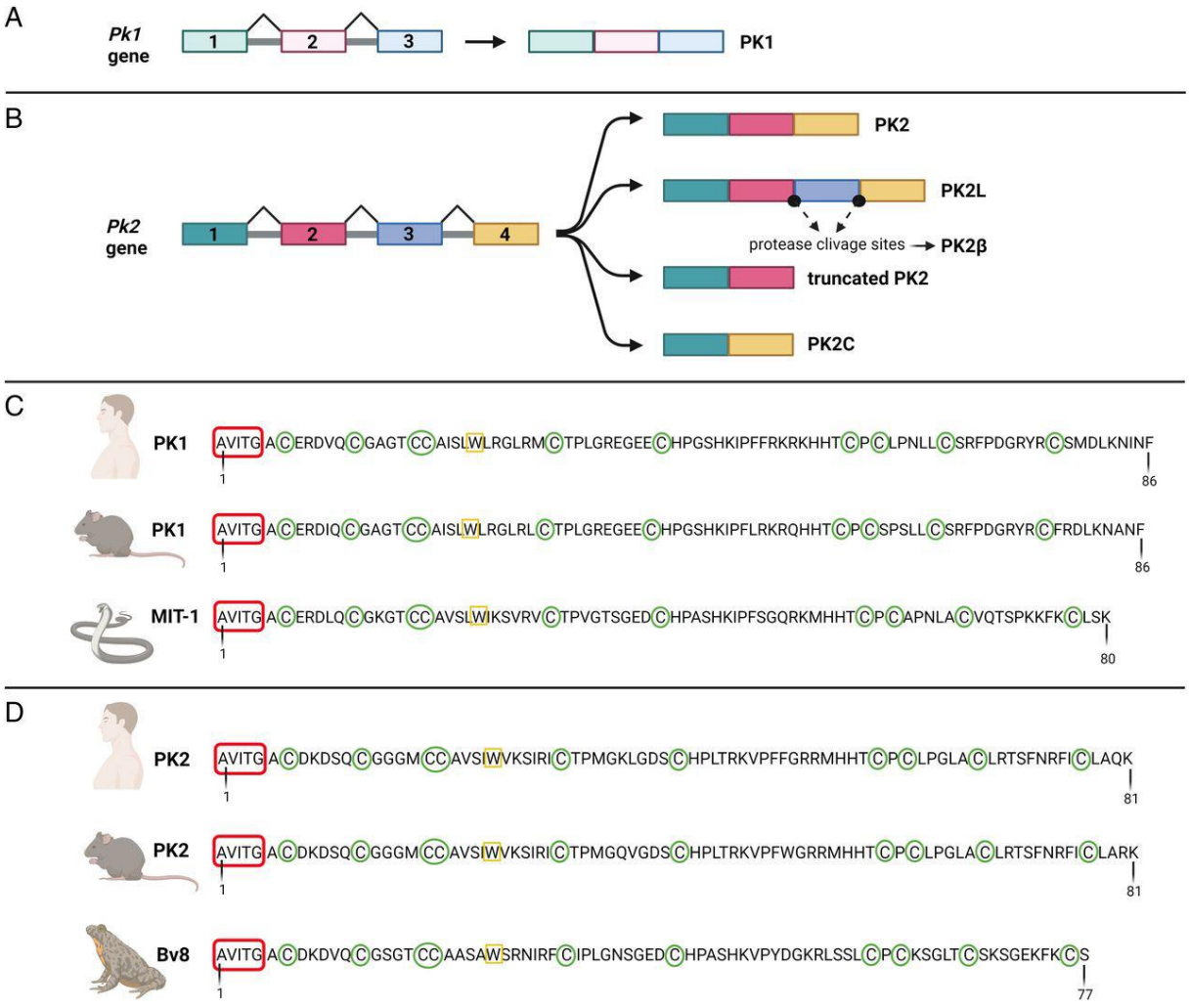


Figure 18 Représentation schématique des systèmes prokinéticines. *(Source : Vincenzi et al., 2023)*
(A, B) Gènes des prokinéticines et leurs isoformes issues de l'épissage. (C, D) Séquence d'acides aminés des prokinéticines de mammifères, de la toxine intestinale de la mamba 1 et de Bv8

4.1 Signalisation intracellulaire activée

Lorsqu'ils se lient à PROK1 ou PROK2, ces récepteurs activent principalement :

- La voie Gq, provoquant une hausse des concentrations du Ca^{2+} intracellulaire elle active la phospholipase C, essentielle à la contraction musculaire et à certaines fonctions cellulaires,
- La voie Gi, bien qu'inhibant l'adénylate cyclase, stimule souvent la prolifération cellulaire en activant ERK via des mécanismes indépendants de l'AMPc (New & Wong, 2007)

- Également, dans certains contextes, Gs et le recrutement de β-arrestines, notamment β-arrestine 2, impliquée dans la régulation du récepteur, sont activées (Casella & Ambrosio, 2021; Lattanzi et al., 2018, 2024)

Principales caractéristiques structurales et fonctionnelles du système prokinéticine/prokinéticine-récepteur : implications physiopathologiques et thérapeutiques

Cette synthèse met en lumière les éléments structuraux et les mécanismes de signalisation du système prokinéticine, permettant de comprendre la diversité de ses effets biologiques et d'envisager des approches thérapeutiques ciblées.

- PROK1/PROK2 : peptides de 86 et 81 aa, riches en ponts disulfures et porteurs du motif AVITGA.
- PROKR1/PROKR2 : RCPG glycosylés, exprimés dans divers tissus (intestin, endothélium, système nerveux).
- Signalisation : Gq → Ca^{2+} ; Gi → ERK ; Gs/β-arrestine → autres voies modulatrices.

Ces caractéristiques structurales et leurs modes d'activation expliquent la diversité des fonctions biologiques des prokinéticines, de la motilité digestive (Li et al., 2001a) à l'angiogenèse (LeCouter et al., 2001), en passant par la neurogenèse (Ng et al., 2005), la douleur (Negri et al., 2009), les rythmes circadiens (Cheng et al., 2002) et la reproduction (Traboulsi et al., 2015). Ces caractéristiques structurales ont permis de concevoir des stratégies thérapeutiques ciblées, notamment via des inhibiteurs capables de bloquer sélectivement les effets biologiques délétères des prokinéticines.

4.2 Inhibiteurs des prokinéticines

Plusieurs composés antagonistes non peptidiques ont été développés pour inhiber l'interaction des ligands PROK avec leurs récepteurs PROKR (**Figure 19**) :

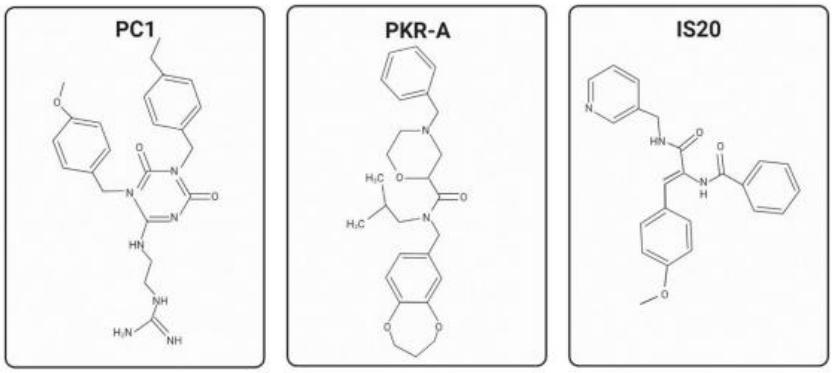


Figure 19 Structures chimiques des antagonistes PC1 et PKR-A, ainsi que de l'agoniste IS20

1. **Triazines-guanidines** : Il s'agit de petites molécules comprenant trois triazines et une guanidine, conçues pour bloquer l'interaction ligands-récepteurs de façon compétitive. Parmi elles, les plus étudiées sont **PC-1, PC-7 et PC-25**, capables de se lier aux récepteurs PROKR et d'en inhiber l'activité, il est cependant plus spécifique de PROKR1 que PROKR2 (Balboni et al., 2008 ; Lattanzi et al., 2015)
2. **IS20** se lie de manière spécifique à un site allostérique du récepteur PROKR1, induisant des effets cardioprotecteurs (Gasser et al., 2015).
3. Antagonistes spécifiques de PROKR2 :
   - **PKRA505** : un antagoniste sélectif du **PROKR2**, développé pour cibler de façon spécifique ce récepteur et inhiber les fonctions médiées notamment par PROKR2 de Dr. QY Zhou (Université d'Irvine en Californie, États-Unis).
   - PKRA7 : un inhibiteur compétitif de PROK2, efficace sur les deux récepteurs PROKR1 et PROKR2. Cette molécule est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et d'inhiber significativement les effets biologiques médiés par PROK2 (Ito et al., 2016).

L'un des champs les plus explorés de l'activité des prokinéticines concerne leur rôle pro-inflammatoire, notamment via la régulation des cellules immunitaires et des cytokines. Cette action est étroitement liée aux effets décrits dans le chapitre 1 de cette thèse.

4.2.1 Mécanismes d'action et applications biologiques

- **Blocage du système PROK/PROKR** : Ces antagonistes empêchent le ligand (PROK1 ou PROK2) de se lier à son récepteur, interrompant la signalisation en aval (Ca^{2+}, ERK, etc.) (Bullock et al., 2004; Reynaud et al., 2021).
- Processus physiopathologiques étudiés :

- PKRA7 empêche la progression de l'arthrite expérimentale chez la souris, en inhibant l'infiltration exacerbée de macrophages et la production de cytokines inflammatoires (IL-1β, IL-6, TNF-α) dans le tissu synovial, ce qui réduit significativement la sévérité de la maladie (Ito et al., 2016). En parallèle à leurs effets inflammatoires, les prokinéticines exercent également une influence majeure sur l'angiogenèse, un processus tout aussi essentiel dans la physiopathologie des tissus endommagés et tumoraux, comme vu dans le chapitre 2.
- PKRA7 a également des effets anti-angiogéniques et anti-tumoraux, en particulier dans les modèles de glioblastome et de cancer du pancréas (Curtis et al., 2013) au moins deux références.
- D'autres études ont utilisé la PKRA7 pour atténuer l'hyperalgésie viscérale liée à la cystite, ou encore pour protéger les fonctions cardiaques dans un modèle de diabète induit (Chen et al., 2015 ; Yang et al., 2020)

4.3 Rôle des prokinéticines dans l'inflammation

Les prokinéticines, et particulièrement PROK2, jouent un rôle central dans la régulation de la réponse inflammatoire, en modulant l'activité des cellules immunitaires et la production de cytokines pro-inflammatoires (Lattanzi & Miele, 2021).

1. Surexpression dans les contextes inflammatoires

PROK2 est fréquemment surexprimé dans divers modèles pathologiques inflammatoires, tels que les tissus articulaires arthritiques et les organes affectés par des infections ou des lésions (Martucci et al., 2006; Negri et al., 2007). Cette surexpression signe son rôle en tant que médiateur local de la réponse inflammatoire (Catalano et al., 2010), qui favorise le recrutement et l'activation locale des cellules immunitaires.

2. Recrutement et activation des cellules immunitaires

Le système immunitaire mobilise et active diverses cellules pour répondre à une inflammation, un processus dans lequel la prokinéticine 2 (PROK2) joue un rôle clé.

- Migration des leucocytes : PROK2 agit comme une chimiokine, attirant les neutrophiles, monocytes et lymphocytes vers le site inflammatoire, ce qui amplifie l'infiltration leucocytaire (Martucci et al., 2006).

➢ Activation macrophagique : PROK2 induit l'activation des macrophages, entraînant une libération accrue de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β et le TNF-α, essentiels à l'amplification du processus inflammatoire (Negri et al., 2007).

3. Modulation expérimentale par antagonistes

➢ Administration de PROK2 dans des modèles murins : La PROK2 augmenterait l'infiltration leucocytaire, caractérisée par un afflux de neutrophiles, de macrophages et de cytokines inflammatoires (Negri & Ferrara, 2018).

➢ Utilisation d'antagonistes PROK/PROKR (comme PKRA7 ou PKRA505) : dans des modèles d'arthrite ou d'inflammation systémique (par exemple induite par lipopolysaccharides). Ces antagonistes :

- Réduisent significativement l'infiltration leucocytaire,
- Diminuent la production d'IL-1β, TNF-α, IL-6,
- Allègent les manifestations cliniques, comme le gonflement articulaire et la douleur (Ito et al., 2016).

4.4 Prokinéticines et angiogenèse

1. Identification de PROK1 comme facteur angiogénique

➢ PROK1 a été initialement identifié sous le nom d'EG-VEGF (*Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor*), en raison de sa capacité à stimuler la prolifération, la migration et la perméabilité des cellules endothéliales des glandes endocrines (par exemple : ovaire, placenta, testicule, surrénale).

➢ Ce facteur angiogénique se distingue du VEGF classique, car il agit de manière spécifique sur certains lits vasculaires et pas sur d'autres, ce qui en fait un régulateur plus spécifique du réseau vasculaire (LeCouter et al., 2001).

2. Multi-fonctionnalité dans la néo-angiogenèse

PROK1 et PROK2 peuvent induire la néoformation vasculaire (angiogenèse) dans plusieurs contextes expérimentaux :

- Dans les tumeurs, la signalisation PROK/PROKR contribue à la survie et l'expansion du réseau vasculaire tumoral, favorisant la croissance tumorale (Nagano et al., 2007).

- Dans les tissus ischémiques (comme ceux touchés par un infarctus), PROK1 et PROK2 stimulent la formation de nouveaux vaisseaux pour restaurer l'apport sanguin (Vincenzi et al., 2023).

Ces observations suggèrent que la famille des prokinéticines remplit un rôle fondamental dans la régénération vasculaire ciblée, avec un potentiel thérapeutique important dans l'angiogenèse pathologique des tumeurs et des maladies ischémiques (Vincenzi et al., 2023).

3. Applications cliniques potentielles

Pathologies tumorales : le blocage de PROK1/PROK2 ou de leurs récepteurs pourrait réduire l'angiogenèse tumorale, limitant ainsi la croissance et la progression des tumeurs (Traboulsi et al., 2017).

Maladies ischémiques : l'administration contrôlée de PROK pourrait favoriser la revascularisation dans les zones endommagées, offrant une stratégie innovante de thérapie réparatrice (Vincenzi et al., 2023).

4.5 Prokinéticines et pathologies pulmonaires

Dans les pathologies respiratoires chroniques, l'inflammation et l'angiogenèse constituent deux axes pathogéniques majeurs (Walsh & Pearson, 2001).. L'ensemble de ces données montre que les prokinéticines relient deux axes pathogéniques majeurs, l'inflammation et néo-angiogenèse, qui se retrouvent au cœur des maladies respiratoires chroniques.

1. Expression pulmonaire et fonctions physiologiques

Dans le poumon, les prokinéticines (PROK1, PROK2) sont exprimées dans plusieurs types cellulaires : les cellules épithéliales des voies aériennes, les cellules endothéliales vasculaires et les macrophages résidents (Chauvet et al., 2015).

- La perméabilité vasculaire, influençant le passage des liquides vers le parenchyme.
- La réponse inflammatoire, via recrutement et activation des cellules immunitaires.
- Le remodelage tissulaire, jouant un rôle dans la cicatrisation et la fibrose.

2. Potentiel thérapeutique

Antagonistes PROK/PROKR (ex. PKRA7, PKRA505) pourraient constituer des molécules prometteuses pour :

- Réduire la vaso-permeabilité excessive et l'infiltration inflammatoire des voies respiratoires.
- Inhiber la production de mucus.
- Limiter l'évolution de la fibrose par modulation des voies TGF-β/IL-13.

En résumé, les prokinéticines apparaissent comme des acteurs biologiques de premier plan dans les processus inflammatoires et angiogéniques. Leur expression dans les tissus pulmonaires, et leur influence sur la perméabilité vasculaire, la fibrose et le recrutement immunitaire, font d'elles des cibles potentielles dans des pathologies complexes telles que la mucoviscidose. Le chapitre suivant approfondira ce lien en s'appuyant sur les données récentes relatives à cette maladie. Cette double implication justifie leur exploration approfondie dans le contexte particulier de la mucoviscidose, qui conjugue dérégulations inflammatoires, anomalies vasculaires et altérations du tissu bronchique. Ces mécanismes seront particulièrement éclairants dans le chapitre suivant, où nous verrons que la mucoviscidose constitue un modèle pathologique illustrant à la fois une inflammation persistante et une angiogenèse altérée.

Chapitre 4 : Le système respiratoire et la mucoviscidose

Partie 1 : Le système respiratoire

Introduction

Chaque jour, un être humain inhale environ 14 000 litres d'air. La respiration rythme nos vies et conditionne notre survie. L'air atmosphérique est composé principalement de diazote (78 %) et de dioxygène (21 %), le reste étant constitué de gaz rares. Parmi ces gaz, seul le dioxygène (O_2) est utilisé par l'organisme.

Au niveau cellulaire, l'O_2 est indispensable : il permet la réaction chimique avec les glucides, produisant l'énergie nécessaire au fonctionnement des organes. Ce processus génère en parallèle du dioxyde de carbone (CO_2), un déchet gazeux qui doit être éliminé. L'oxygénation et l'élimination du CO_2 se déroulent dans les poumons, qui constituent l'interface majeure entre l'air et le sang.

Les poumons sont des organes hautement vascularisés, dotés de deux circulations complémentaires : l'une assure l'oxygénation, l'autre participe à l'élimination du CO_2.

Organisation générale du système respiratoire

Le système respiratoire, aussi appelé *arbre respiratoire*, se divise en deux grandes parties :

1. **Les voies aériennes**, qui conduisent l'air.
2. **Le parenchyme pulmonaire**, où ont lieu les échanges gazeux.

Les voies aériennes

Elles se classent en deux ensembles selon leur localisation :

- **Voies extra-pulmonaires** :
    - *Supérieures* : fosses nasales, nasopharynx, larynx.
    - *Inférieures* : trachée et bronches principales (ou bronches souches), formant l'arbre trachéo-bronchique.
- **Voies intra-pulmonaires** :
    - Bronches lobaires, segmentaires, sous-segmentaires et sus-lobulaires.

- Bronchioles terminales et respiratoires.

Le parenchyme pulmonaire

Le parenchyme débute à l'extrémité des bronchioles, avec les conduits alvéolaires et les alvéoles. C'est la **zone respiratoire**, siège des échanges gazeux au niveau de la barrière alvéolo-capillaire. La zone aérienne, en amont, correspond quant à elle à la **zone de conduction de l'air**.

Les poumons

Les poumons sont les organes centraux de la respiration. Ils se situent dans la cavité thoracique et sont séparés par le médiastin, qui contient notamment le cœur, l'œsophage, la trachée et les bronches principales. Chaque poumon est recouvert par la plèvre, une double membrane qui les isole de la paroi thoracique.

Chez l'Homme, le poumon droit est divisé en trois lobes, tandis que le poumon gauche n'en possède que deux, pour laisser la place au cœur. De la trachée jusqu'aux bronchioles, l'ensemble des conduits respiratoires est tapissé d'un épithélium qui joue un rôle essentiel de barrière et de protection contre les agressions extérieures.

Structure histologique de l'arbre trachéo-bronchique

Les voies aériennes inférieures sont tapissées d'un **épithélium cylindrique pseudostratifié**, reposant sur une **lame basale**. Cet épithélium contient plusieurs types cellulaires spécialisés qui assurent la protection et la clairance des voies respiratoires.

Sous l'épithélium, la composition de la paroi varie selon le calibre des voies (**Figure 20**) :

- Dans les **bronches**, on trouve une *lamina propria*, une couche de muscle lisse, des glandes séro-muqueuses, des capillaires et une armature cartilagineuse.
- Dans les **bronchioles**, le cartilage et les glandes disparaissent : seule une couche de muscle lisse et les capillaires subsistent.
- Dans les **alvéoles**, l'organisation change complètement : la lame basale sépare d'un côté les pneumocytes (cellules épithéliales spécialisées) et le surfactant, et de l'autre le septum interalvéolaire et les capillaires.

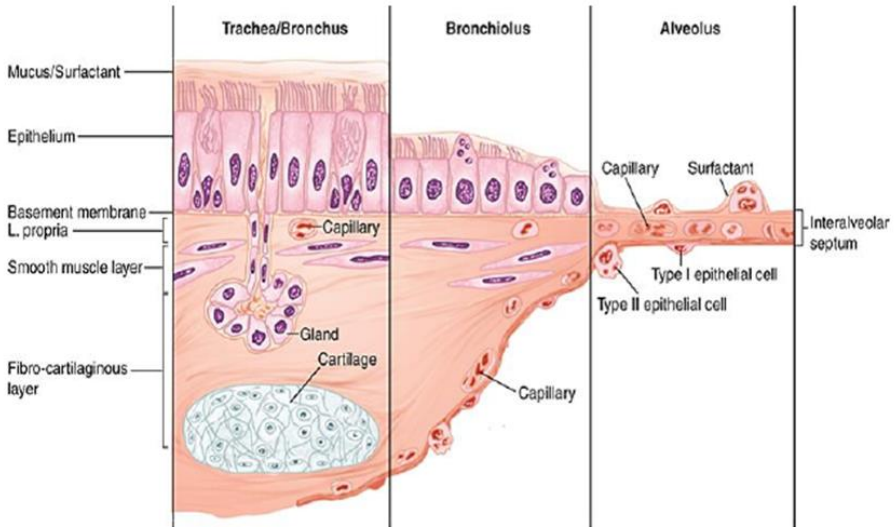


Figure 20 Schéma de la transition cellulaire et tissulaire de l'arbre respiratoire depuis la trachée/bronches jusqu'aux alvéoles. *(Source:* Ganong's Review of Medical Physiology, 25th Ed., Barrett K.E. et al., 2015.*)*

Les cellules de l'épithélium trachéo-bronchique

1. Les cellules basales

Elles représentent environ 30 % des cellules de l'épithélium mucociliaire pseudostratifié (Mercer et al., 1994). Situées directement sur la lame basale, elles ne sont pas en contact avec la lumière des voies aériennes.

Ces cellules de petite taille, de forme pyramidale, possèdent un noyau relativement volumineux (5 à 7 µm). Elles sont ancrées à la lame basale par des hémidesmosomes, et reliées aux cellules sécrétrices et ciliées par des desmosomes, assurant ainsi la stabilité de l'épithélium (Evans et al., 1989).

2. Les cellules ciliées

Elles représentent 50 à 90 % de la population cellulaire (Spina, 1998). Ces cellules cylindriques et allongées possèdent environ 300 cils chacune (Knight & Holgate, 2003).

Par leurs battements coordonnés, à une fréquence de **10 à 20 Hz**, les cils propulsent le mucus et les particules (> 25 nm) vers la bouche. Les cils contribuent aussi à la sécrétion de mucines (MUC1, MUC4, MUC20), projetées en surface avec l'aide des microvillosités (Hattrup & Gendler, 2008; Kesimer et al., 2013).

3. Les cellules caliciformes (ou mucosécrétantes)

Elles représentent 5 à 15 % des cellules épithéliales. De forme polarisée, elles contiennent dans leur pôle apical des granules de mucines et, à la base, le noyau.

Ces cellules produisent le mucus qui recouvre les voies aériennes et participe à la clairance mucociliaire (Breeze & Wheeldon, 1977). En cas d'infection ou de pathologie, leur nombre peut augmenter de façon significative (Turner et al., 2011).

4. Les cellules intermédiaires ou parabasales

Situées au-dessus des cellules basales, elles sont présentes dans l'épithélium trachéo-bronchique mais absentes dans les voies de conduction les plus distales (Boers et al., 1998). Elles apparaissent lors du processus de stratification épithéliale et peuvent dériver de la division des cellules caliciformes (Ayers & Jeffery, 1988).

Les cellules de l'épithélium bronchiolaire

À mesure que l'on progresse dans l'arborisation pulmonaire, la structure de l'épithélium se modifie. Les premières bronchioles conservent encore une organisation proche de celle des bronches, avec la présence de cellules ciliées, basales et caliciformes. Cependant, plus on avance vers les bronchioles distales, plus ces cellules se raréfient et laissent la place à des types cellulaires spécifiques. Deux populations deviennent alors prédominantes : les cellules club et les cellules neuroendocrines. Dans les bronchioles les plus fines, l'épithélium est presque exclusivement constitué de cellules club, adaptées à ce microenvironnement.

Les cellules club

Autrefois appelées *cellules de Clara*, les cellules club sont caractéristiques des bronchioles. Elles ont une forme cuboïde et se distinguent par un cytoplasme riche en réticulum endoplasmique granulaire, particulièrement dense au niveau apical et basal. Leur rôle est multiple : elles produisent du surfactant, sécrètent des mucines et diverses protéines protectrices, et participent ainsi au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale.

Un autre aspect fondamental de ces cellules réside dans leur capacité de régénération. En cas d'agression chronique ou de dommage tissulaire, elles peuvent se différencier en cellules ciliées

ou caliciformes, assurant le renouvellement de l'épithélium (Davis & Dickey, 2008; Hong et al., 2001). De ce fait, elles sont considérées comme de véritables cellules progénitrices au sein de l'épithélium bronchiolaire.

Les cellules neuroendocrines pulmonaires

Les cellules neuroendocrines, quant à elles, sont des cellules pyramidales reposant directement sur la lame basale. Elles peuvent apparaître isolées — on les appelle alors PNEC (*Pulmonary Neuroendocrine Cells*) — ou regroupées en petits amas formant des corpuscules neuroépithéliaux (NEB).

Leur fonction principale est de réguler l'activité de l'épithélium par la sécrétion de neuropeptides. Ces molécules leur confèrent une action endocrine et paracrine, capable d'influencer la sécrétion de mucus, l'activité ciliaire, mais aussi le tonus vasculaire. Les cellules neuroendocrines jouent donc un rôle de signalisation important, en particulier dans l'adaptation de l'appareil respiratoire aux variations de l'environnement.

Les cellules de l'épithélium alvéolaire

En atteignant les alvéoles, l'organisation histologique change radicalement. Ici, la structure doit être optimisée pour maximiser les échanges gazeux entre l'air et le sang. L'épithélium alvéolaire est essentiellement composé de deux types cellulaires : les pneumocytes de type I et les pneumocytes de type II.

Les pneumocytes de type I

Les pneumocytes de type I recouvrent environ 95 % de la surface alvéolaire. Ce sont de larges cellules aplaties, de 50 à 100 µm de diamètre, qui s'étalent pour former une paroi extrêmement fine. Leur cytoplasme contient quelques ribosomes, lysosomes et vésicules de micropinocytose (Stone et al., 1992), tandis que leur noyau est renflé vers la lumière alvéolaire.

Ces cellules sont reliées entre elles par des jonctions serrées, et leur lame basale fusionne avec celle des cellules endothéliales des capillaires, réduisant l'épaisseur de la barrière alvéolo-capillaire. Cette adaptation permet des échanges gazeux rapides et efficaces. Les pneumocytes de type I ne possèdent cependant pas la capacité de se diviser, ce qui rend leur renouvellement dépendant des pneumocytes de type II.

Les pneumocytes de type II

Occupant les 5 % restants de la surface alvéolaire, les pneumocytes de type II sont de forme cubique et beaucoup plus petits (environ 9 µm de diamètre). On les retrouve généralement isolés ou regroupés par deux ou trois entre les pneumocytes de type I. Leur principale caractéristique morphologique est la présence de corps lamellaires, qui occupent près de 25 % du cytoplasme. Ces structures contiennent le surfactant, un mélange riche en phospholipides (≈ 90 %), en protéines et en lipides (Fehrenbach, 2001; Goerke, 1998).

Le surfactant a pour rôle de réduire la tension de surface à l'intérieur des alvéoles. Sans lui, les alvéoles s'affaisseraient à l'expiration, rendant la respiration impossible. En plus de cette fonction essentielle, les pneumocytes de type II possèdent la capacité de proliférer et de se différencier en pneumocytes de type I. Ils sont donc considérés comme les cellules souches de l'alvéole, assurant à la fois son entretien et sa réparation.

Les jonctions intercellulaires

Les cellules épithéliales sont soudées entre elles par des complexes de jonctions spécialisés. Ces structures, disposées de l'apical vers le basal, assurent à la fois la cohésion mécanique et le contrôle des échanges.

*1. Les jonctions serrées (***Tight junctions***)*

Placées au pôle apical, elles scellent l'espace intercellulaire et forment une barrière imperméable. Leur rôle est d'empêcher le passage incontrôlé d'eau, de solutés et de molécules entre les cellules, garantissant ainsi l'étanchéité de l'épithélium (Harhaj & Antonetti, 2004).

Elles sont constituées de plusieurs protéines transmembranaires :

- **Les claudines**, protéines majeures qui régulent le passage sélectif des solutés via leurs boucles extracellulaires.
- **L'occludine**, impliquée à la fois dans l'adhérence intercellulaire et dans la résistance transépithéliale.
- **Les JAM (Junctional Adhesion Molecules)**, appartenant à la famille des immunoglobulines, capables d'interagir avec d'autres protéines comme ZO-1 ou les intégrines des leucocytes.

Ces protéines sont reliées au cytosquelette d'actine via des adaptateurs intracellulaires tels que ZO-1 et la cinguline, assurant ainsi la solidité du complexe. Les JAM, en particulier la JAM-A, participent aussi à la transmigration leucocytaire, processus clé lors des réponses inflammatoires (Bazzoni, 2003).

2. Les jonctions adhérentes (*Adherens junctions*)

Situées juste sous les jonctions serrées, elles jouent un rôle central dans l'ancrage cellulaire et la régulation de la forme de l'épithélium. Elles forment un anneau continu qui relie les cellules entre elles et les connecte au cytosquelette d'actine.

Leur principal composant est la famille des cadhérines (E-cadhérine, N-cadhérine). Ces glycoprotéines transmembranaires établissent des liaisons homophiliques entre cellules voisines, mais uniquement en présence de calcium extracellulaire, qui rigidifie leurs domaines extracellulaires (Kim et al., 2011).

Les cadhérines s'associent à des protéines intracellulaires (caténines, plakoglobine), formant un complexe robuste. Cette organisation confère à l'épithélium une capacité de résistance mécanique, mais aussi de réorganisation dynamique, notamment lors du développement embryonnaire ou de la régénération tissulaire (C. P. Chen et al., 2005).

3. Les desmosomes

Plus bas dans la membrane latérale, les desmosomes assurent une cohésion mécanique renforcée. Contrairement aux jonctions serrées ou adhérentes, ils sont connectés non pas au cytosquelette d'actine mais aux filaments intermédiaires.

Ils sont constitués de trois familles de protéines :

- **Les cadhérines desmosomales** (desmogléines, desmocollines).
- **Les protéines armadillo** (plakoglobine, plakophiline).
- **Les protéines plakin**, en particulier la desmoplakine, qui relie le complexe au cytosquelette (Kowalczyk & Green, 2013).

Grâce à cette architecture, les desmosomes permettent au tissu épithélial de résister aux contraintes mécaniques importantes. Leur dysfonction peut perturber la prolifération et la migration cellulaire, et a été impliquée dans certaines pathologies pulmonaires, y compris des cancers (Müller et al., 2021).

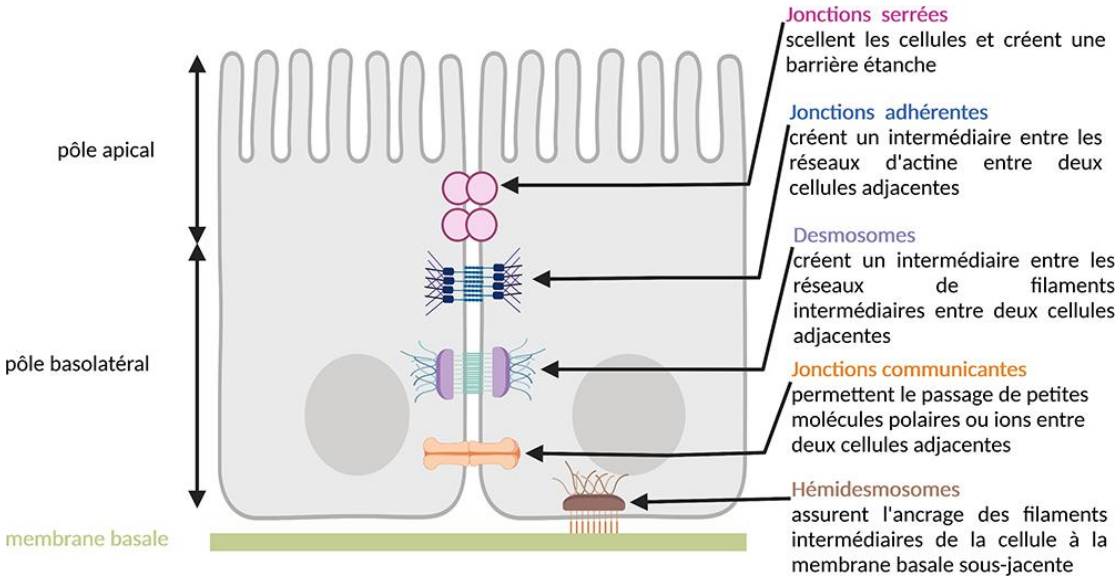


Figure 21 Organisation des principales jonctions intercellulaires dans un épithélium polarisé.

La clairance mucociliaire

Les poumons sont en contact permanent avec l'air extérieur et donc exposés à de nombreux agents potentiellement nocifs : poussières, polluants, allergènes, bactéries, virus ou champignons. Pour s'en protéger, l'appareil respiratoire a développé un mécanisme de défense très efficace : la clairance mucociliaire.

Ce système repose sur la production d'un **mucus** qui recouvre la surface épithéliale et sur le battement coordonné des cils des cellules ciliées, qui propulsent ce mucus vers le pharynx où il sera avalé ou éliminé par la toux. Ce tapis roulant biologique assure ainsi l'élimination continue des particules et micro-organismes inhalés (Zahm et al., 1989).

Le bon fonctionnement de la clairance mucociliaire repose sur trois éléments étroitement interdépendants : les mucines**,** les cils et le liquide de surface des voies aériennes (Airway Surface Liquid, ASL) (Davis & Lazarowski, 2008).

Le liquide périciliaire

Le mucus repose sur une couche aqueuse fluide, le liquide périciliaire (ou phase sol), dans laquelle baignent les cils. Son épaisseur moyenne est d'environ 7 µm, juste suffisante pour permettre aux cils de battre librement.

Ce liquide est produit et régulé par des flux ioniques transépithéliaux, principalement à travers les canaux au sodium (Na^+) et au chlorure (Cl^-). Ces mouvements ioniques entraînent le passage d'eau, maintenant ainsi l'hydratation de la surface épithéliale (Tarran, 2004).

Un équilibre précis est nécessaire :

- ✓ Si la phase sol est trop fine, les cils se trouvent englués dans le mucus et perdent leur mobilité ;
- ✓ Si elle est trop épaisse, le contact avec le mucus devient insuffisant et la propulsion est inefficace.

Le liquide périciliaire contient également des molécules à rôle antimicrobien (lysozyme, défensines), des antioxydants et des antiprotéases qui renforcent la protection de l'épithélium (Bals & Hiemstra, 2004).

Le mucus

Au-dessus du liquide périciliaire se trouve la couche de mucus proprement dite, également appelée phase gel. Sécrété par les cellules caliciformes et les glandes séro-muqueuses, ce mucus constitue une barrière viscoélastique capable de piéger efficacement les particules et micro-organismes inhalés.

Sa composition est dominée par l'eau (≈ 95 %), mais il contient aussi des glycoprotéines, des protéines (≈ 3 %), des lipides, ainsi que des ions et minéraux. Les composants clés sont les mucines, de grandes glycoprotéines fortement glycosylées, responsables de la viscosité et de l'élasticité du mucus (Puchelle et al., 1983).

En conditions pathologiques, comme dans la mucoviscidose ou la BPCO, la composition du mucus est altérée : les mucines sont produites en excès, entraînant une augmentation de la viscosité qui perturbe la clairance mucociliaire.

Le battement ciliaire

Le dernier élément de ce système est le battement coordonné des cils des cellules ciliées. Chaque cellule en porte environ 300, disposés à sa surface apicale.

Les cils ont une structure interne très organisée, l'axonème, caractérisée par un arrangement dit *9+2* : neuf doublets périphériques de microtubules entourant deux microtubules centraux. Cette architecture permet aux protéines motrices (dynéines) de faire glisser les microtubules les uns par rapport aux autres, générant un mouvement ondulatoire (Moore et al., 2004).

Le cycle de battement ciliaire comporte deux phases :

1. Une **phase active**, où le cil se redresse et propulse le mucus vers l'oropharynx ;
2. Une **phase de retour**, plus passive, durant laquelle le cil se replie dans le liquide périciliaire pour revenir à sa position initiale (Sears et al., 2013).

La coordination des cils, qui battent à une fréquence de 10 à 20 Hz, permet une progression régulière du mucus, comparable à un tapis roulant biologique.

Le système respiratoire repose sur une organisation cellulaire fine et sur des mécanismes de défense sophistiqués, en particulier la clairance mucociliaire. Lorsque ces mécanismes fonctionnent correctement, l'épithélium pulmonaire parvient à éliminer efficacement les particules, les agents pathogènes et les agressions environnementales, tout en maintenant une respiration fluide et efficace.

Cependant, dans certaines pathologies, ces systèmes de protection se trouvent gravement compromis. La mucoviscidose en est un exemple particulièrement marquant. Cette maladie génétique affecte principalement la régulation ionique de l'épithélium, ce qui perturbe l'équilibre hydrique du liquide périciliaire et modifie profondément la composition du mucus. Résultat : le mucus devient visqueux, adhérent et difficile à évacuer.

Cette altération entraîne un cercle vicieux pathologique :

1. L'épaississement du mucus freine la clairance mucociliaire ;
2. Les agents pathogènes s'accumulent et colonisent les voies aériennes ;
3. Une inflammation chronique s'installe, aggravant les lésions épithéliales et compromettant encore davantage la fonction pulmonaire.

Ainsi, la mucoviscidose illustre parfaitement comment un défaut moléculaire ciblant une protéine (le **CFTR**, régulateur de transport ionique) peut avoir des répercussions systémiques en perturbant un équilibre physiologique aussi central que la clairance mucociliaire.

Partie 2 : La mucoviscidose

1.Généralités

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive, multiviscérale, induite par une mutation du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*)(Ramananda et al., 2024). Ce gène est localisé sur le bras long du chromosome 7, précisément en 7q31.2. Le gène CFTR code une protéine membranaire essentielle au transport des ions chlorure (Cl^-) à travers les épithéliums, en particulier au niveau des poumons, du pancréas, du foie, des intestins et des glandes sudoripares.

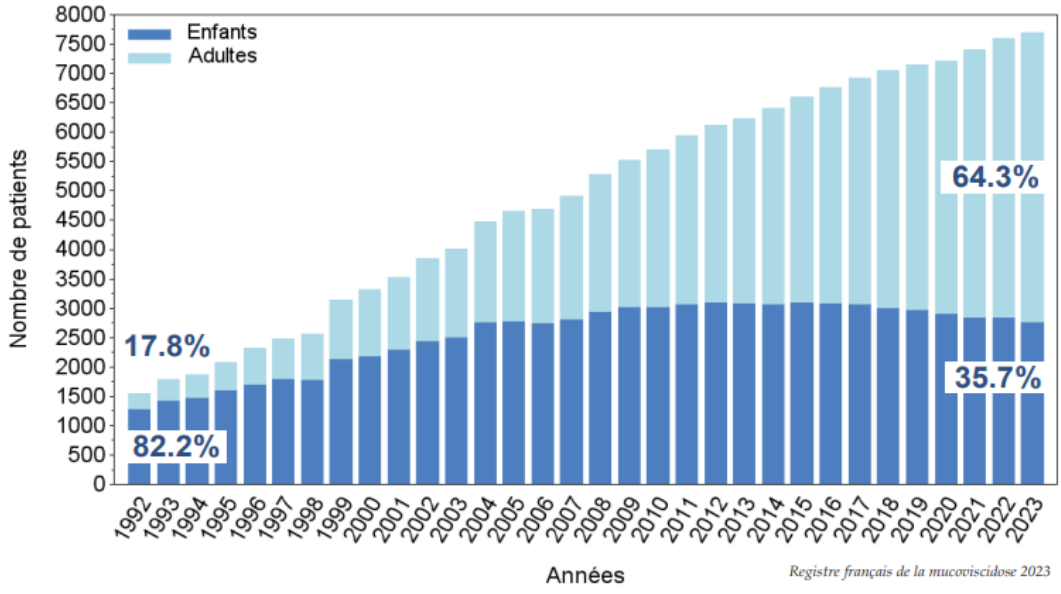


Figure 22 Évolution du nombre de patients atteints de mucoviscidose en France de 1992 à 2023 *(Source : Registre français de la mucoviscidose, 2023.)*
Le graphique montre l'augmentation du nombre de patients et le vieillissement de la population atteinte de mucoviscidose en France. La proportion d'adultes est passée de 17,8 % en 1992 à 64,3 % en 2023, traduisant une amélioration de l'espérance de vie.

La mucoviscidose a été décrite pour la première fois sous le nom de *fibrose kystique du pancréas* lors d'une autopsie d'un enfant qui présentait plusieurs signes cliniques caractéristiques de la pathologie: infections pulmonaires récurrentes, malabsorption des nutriments lipidiques et protéiques, ainsi qu'un retard staturo-pondéral marqué (Andersen, 1938). À cette époque, on pensait que l'atteinte était limitée au pancréas.

Quelques années plus tard, d'autres atteintes viscérales ont été observées, notamment au niveau des poumons et du système digestif, caractérisées par la présence d'un mucus anormalement épais et visqueux obstruant les canaux et les voies respiratoires. Ce mucus pathologique est à l'origine du terme *mucoviscidose*, proposé par Farber en 1943 (Farber, 1943).

En 1948, des chercheurs ont découvert une concentration excessive d'ions chlorure (Cl^-) et sodium (Na^+) dans la sueur des patients atteints, suggérant un dysfonctionnement du transport ionique à travers les cellules épithéliales. Cette découverte a conduit à la mise au point du test de la sueur, développé par Di Sant'Agnese et al. en 1953 (Di Sant'agnese et al., 1953), puis perfectionné par Gibson et Cooke en 1959 (Gibson & Cooke, 1959). Ce test, qui mesure la concentration en ions chlorures dans la sueur, reste aujourd'hui un outil de diagnostic de référence pour détecter la mucoviscidose chez les nourrissons et les enfants (Gibson & Cooke, 1959).

	Années d'enquête										
Indicateurs	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Patients recensés*	6239	6417	6617	6772	7060	7163	7270	7367	7512	7728	7801
Patients vus dans l'année**	6228	6403	6606	6764	6918	7054	7143	7203	7411	7598	7688
Enfants	3077	3061	3085	3070	3052	3002	2956	2897	2834	2834	2746
- dont greffés pulmonaires	23	24	21	20	17	13	14	15	8	7	4
Adultes	3151	3342	3521	3694	3866	4052	4187	4306	4577	4764	4942
- dont greffés pulmonaires	598	649	695	764	818	854	882	911	913	884	847
+ de 40 ans	508	584	668	757	823	907	984	1054	1218	1323	1408
- dont greffés pulmonaires	128	164	189	221	251	280	309	336	367	384	392
Hommes	3221	3314	3437	3542	3614	3679	3733	3748	3850	3982	4021
Femmes	3007	3089	3169	3222	3304	3375	3410	3455	3561	3616	3667
Age moyen (années)	20.1	20.7	21.2	21.8	22.3	22.9	23.4	23.9	24.8	25.2	25.7
Age médian (années)	18.2	18.9	19.3	19.9	20.3	20.9	21.3	21.9	22.8	23.4	24.1
Age minimum (années)	0.1	0	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0	0.1
Age maximum (années)	82.5	82.8	83.2	84.1	85.1	86.1	84.6	85.6	86.6	87.6	88

Figure 23 Données épidémiologiques de la mucoviscidose en France *(2013–2023) Source : Registre français de la mucoviscidose, Rapport 2023*

Ce tableau présente l'évolution annuelle des indicateurs clés de la mucoviscidose en France sur la dernière décennie. On observe une augmentation progressive du nombre de patients, un vieillissement de la population (âge médian passé de 18,2 à 24,1 ans), et une hausse notable des patients de plus de 40 ans, reflétant l'amélioration de la prise en charge.

Il est important de noter que plus de 2 000 mutations différentes du gène CFTR ont été identifiées à ce jour, mais seule une fraction d'entre elles est reconnue comme pathogène et associée à la mucoviscidose (*http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html*, s. d.). La mutation la plus fréquente est la ΔF508 (ou F508del), responsable d'environ 70 à 80 % des cas dans les populations d'origine caucasienne.

Selon le dernier recensement de 2023 publié par le registre français de la mucoviscidose (**Figure 22**), un peu plus de 7 800 personnes vivent actuellement avec cette maladie en France. Grâce aux avancées thérapeutiques, notamment les traitements modulant la protéine CFTR (modulateurs CFTR), l'espérance de vie des patients s'est considérablement améliorée au cours des dernières décennies (**Figure 23**).

2. Du gène à la protéine CFTR

A. Le gène CFTR

Chez l'être humain, le gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), référencé sous l'identifiant Gene ID: 1080, est localisé sur le chromosome 7, en position 7q31.2, et non 7q13.2, comme mentionné par erreur dans certaines sources. Cela signifie qu'il se trouve sur le bras long (q) du chromosome 7, à la bande 31.2 (Harris, 1992).

Le gène *CFTR* s'étend sur environ 230 kilobases (kb) d'ADN génomique et comprend 27 exons, ce qui en fait un gène structurellement complexe. Il code pour une protéine transmembranaire composée de 1480 acides aminés, appartenant à la famille des ABC transporteurs (ATP-Binding Cassette), une famille de protéines impliquées dans le transport actif de diverses molécules à travers les membranes cellulaires (Harris, 1992).

L'expression du gène *CFTR* est détectable très précocement, *in utero,* dès les premières étapes de la vie fœtale, et se poursuit tout au long de la vie adulte. Toutefois, le niveau d'expression varie selon les tissus et les stades de développement (Trezise et al., 1993). Les tissus épithéliaux des voies respiratoires, le pancréas, les intestins, le foie et les glandes sudoripares présentent les niveaux d'expression les plus élevés. Cette distribution explique la nature multiviscérale des manifestations cliniques de la mucoviscidose (Blotas et al., 2023; Tümmler et al., 2025). La régulation de l'expression du gène *CFTR* est multifactorielle ; elle dépend en grande partie de l'organisation de la chromatine, en particulier des réarrangements chromatidiens et des éléments régulateurs *cis* situés à distance du promoteur (Gosalia & Harris, 2015). Ces mécanismes influencent l'accessibilité du gène aux facteurs de transcription et participent à la régulation spatio-temporelle de son expression (Blotas et al., 2023).

L'expression de CFTR ne dépend pas uniquement de la structure du gène ou des éléments régulateurs distaux. Les avancées récentes en biologie des systèmes ont montré que la distribution de son expression varie fortement selon les tissus et les sous-populations cellulaires. Pour explorer cette diversité, les approches de transcriptomique à haut débit se sont révélées essentielles, permettant d'obtenir une cartographie précise et dynamique des cellules exprimant *CFTR* dans les épithéliums humains.

Les analyses de transcriptomique unicellulaire (scRNA-seq) ont révélé un paysage beaucoup plus complexe et hétérogène que ce que laissaient penser les études classiques. Historiquement, CFTR était associé aux cellules ciliées et caliciformes des voies aériennes. Toutefois, des travaux majeurs (Montoro et al., 2018; Plasschaert et al., 2018) ont identifié une population rare et hautement spécialisée de cellules épithéliales, appelées ionocytes pulmonaires, représentant moins de 1 % de l'épithélium bronchique mais exprimant des niveaux exceptionnellement élevés de *CFTR*. Ces cellules se distinguent par l'expression de gènes spécifiques tels que *FOXI1* (facteur de transcription maître), *ATP6V1B1* et *ATP6V0D2*, impliqués dans le transport ionique et l'homéostasie acido-basique.

Cependant, CFTR n'est pas exclusivement restreint aux ionocytes. Les données transcriptomiques montrent également une expression plus faible, mais détectable, dans d'autres types cellulaires tels que les cellules club, basales, caliciformes et ciliées. Cette distribution suggère que la régulation du liquide de surface des voies aériennes et du mucus repose sur une coopération multicellulaire, où les ionocytes jouent un rôle de régulation majeure mais avec la contribution d'autres sous-types.

Dans le contexte de la mucoviscidose, l'absence ou la dysfonction de CFTR entraîne une reprogrammation transcriptionnelle de l'épithélium. Plusieurs études ont montré une surexpression de gènes pro-inflammatoires, notamment *IL8*, *IL6* et les chimiokines neutrophiliques (*CXCL1, CXCL2, CXCL3*), même en l'absence d'infection bactérienne (Veit et al., 2012). Ces signatures confirment que CFTR agit comme un régulateur du tonus inflammatoire basal. Ainsi, le défaut de transport ionique ne se limite pas à l'hydratation du mucus mais conditionne également l'équilibre transcriptionnel des cellules épithéliales, les plaçant dans un état "pré-inflammatoire" propice à la chronicité des lésions pulmonaires.

Au-delà du poumon, les analyses transcriptomiques dans d'autres tissus exocrines (pancréas, foie, glandes salivaires) révèlent des profils d'expression variables de CFTR selon les types

cellulaires. Dans le pancréas exocrine, CFTR est principalement exprimé dans les cellules canalaires, où il régule la sécrétion de bicarbonates et le pH luminal. Dans le foie, il est localisé aux cholangiocytes, contribuant à la fluidité et au pH de la bile. Ces observations concordent avec les manifestations multiviscérales de la maladie.

En résumé, la transcriptomique moderne a permis d'identifier les ionocytes comme principaux sites d'expression de CFTR dans l'épithélium respiratoire, tout en mettant en évidence une contribution d'autres sous-populations. Elle a également montré que la perte de fonction de CFTR entraîne une reprogrammation pro-inflammatoire de l'épithélium, reliant directement transport ionique et immunité innée.

B. Structure protéique de CFTR

Traduction et caractéristiques générales

La protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la super-famille des transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*), et plus précisément à la sous-famille ABCC (Riordan et al., 1989; ter Beek et al., 2014). Elle est traduite à partir d'un ARN messager de 6,5 kilobases (Harris, 1992) pour produire une protéine composée de 480 acides aminés. Sa structure tridimensionnelle a été déterminée par cryomicroscopie électronique, une méthode révolutionnaire qui permet l'observation fine de protéines membranaires à haute résolution (Liu et al., 2017).

Localisation tissulaire de CFTR

CFTR est exprimée principalement dans les cellules épithéliales de nombreux organes, notamment les voies respiratoires, le pancréas, les intestins, le système reproducteur, le cerveau, et dans les glandes exocrines telles que les glandes salivaires et sudoripares(Cozens et al., 1994; Engelhardt et al., 1992; Patrizio & Salameh, 1998; Guo et al., 2009; Trezise & Buchwald, 1991; W. Zeng et al., 1997). Cette large distribution explique les manifestations multiviscérales de la mucoviscidose.

Organisation structurale de la protéine

La protéine CFTR est constituée de cinq domaines fonctionnels (**Figure 24**) :

- Deux domaines transmembranaires (MSD1 et MSD2, *Membrane-Spanning Domain*),
- Deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD1 et NBD2, *Nucleotide Binding Domain*),
- Un domaine régulateur (R) unique, spécifique à CFTR.

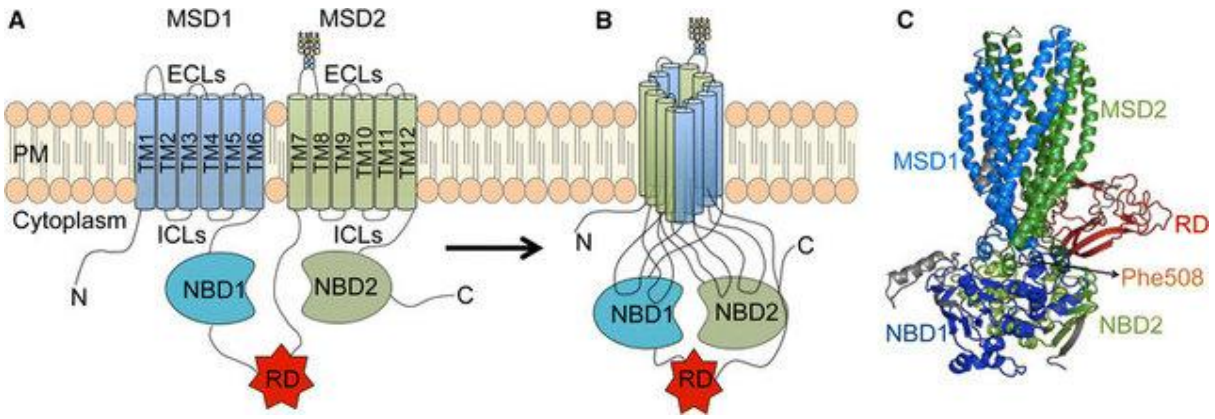


Figure 24 Organisation structurale de la protéine CFTR *(Source : Farinha & Canato.,2017 ; Serohijos et al.,2008)*

Représentation schématique de l'architecture tridimensionnelle de la protéine CFTR.

(a) CFTR est constituée de cinq domaines : deux domaines transmembranaires (MSD1 et MSD2), chacun composé de six hélices α (TM1–6 et TM7–12) formant le pore du canal ; deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD1 et NBD2) localisés dans le cytoplasme ; et un domaine régulateur (RD). (b) L'agencement de ces domaines met en évidence une structure compacte, avec des interactions croisées entre les segments transmembranaires des deux MSD et des contacts étroits entre les boucles intracellulaires et les NBDs. (c) Modélisation de la structure native de CFTR illustrant cette organisation compacte (Serohijos et al.,2008)

Les domaines MSD1 et MSD2 contiennent chacun six segments transmembranaires (TMD), organisés en hélices α qui traversent la membrane cellulaire. Ces segments forment ensemble un pore hydrophile, qui permet le passage sélectif des anions, principalement des ions chlorure (Cl^-) (Ge et al., 2004; Linsdell, 2006; Patrick & Thomas, 2012; Hwang & Kirk, 2013). Les boucles extracellulaires reliant ces segments comprennent notamment une quatrième boucle, située entre TMD7 et TMD8, qui porte deux sites de N-glycosylation, nécessaires au bon repliement et à la stabilité de la protéine (Serohijos et al., 2008; Farinha & Canato, 2017).

Domaines NBD et mécanisme d'activation

Les domaines NBD1 et NBD2 jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'activité du canal CFTR. Ces domaines, situés respectivement dans la région centrale de la protéine (NBD1) et à son extrémité C-terminale (NBD2), sont capables de lier et hydrolyser l'ATP. L'énergie produite par cette hydrolyse déclenche un changement de conformation qui permet l'ouverture du canal et le passage des ions à travers la membrane (Lewis et al., 2004 ; Lewis et al., 2010).

Contrairement à la majorité des transporteurs ABC, qui utilisent l'ATP pour transporter activement des molécules (sucres, peptides, métaux, lipides ou médicaments), CFTR agit comme un canal ionique : il permet un passage ions chlorure à travers les membranes

épithéliales (Dean et al., 2001; Wilkens, 2015). Ce rôle est crucial pour maintenir une bonne hydratation du mucus et assurer le bon fonctionnement des surfaces muqueuses.

Le domaine régulateur (R)

Une caractéristique unique de CFTR dans la famille des ABC est la présence d'un domaine régulateur (R), codé par le 13ème exon du gène CFTR (Riordan et al., 1989). Ce domaine ne participe pas directement à la formation du pore ionique, mais il contrôle l'activité du canal. Pour que CFTR soit activé, le domaine R doit être phosphorylé par des protéines kinases A et C (PKA et PKC), ce qui permet l'ouverture du canal (Rich et al., 1991; Csanády et al., 2000). Ce domaine joue aussi un rôle important dans le trafic intracellulaire, les interactions protéiques et la stabilité membranaire de la protéine CFTR (Chin, Hung et Bear, 2017).

Structure tridimensionnelle de CFTR

Au-delà de cette organisation en domaines, l'étude de la structure tridimensionnelle de CFTR a beaucoup progressé ces quinze dernières années. Les premiers modèles obtenus par modélisation par homologie à partir de transporteurs ABC bactériens (Sav1866, MsbA) ont permis de proposer des conformations ouvertes et fermées du canal et de situer le rôle critique du résidu F508 dans l'interface entre NBD1 et la quatrième boucle intracellulaire (ICL4) du MSD2, dont la délétion explique en grande partie les défauts de repliement de la protéine (Mornon et al., 2009).

La résolution par cryo-microscopie électronique de la première structure humaine de CFTR a constitué une avancée majeure (Liu et al., 2017). Cette structure a révélé un canal en conformation fermée, non phosphorylée, où le domaine R s'insère dans le vestibule intracellulaire et bloque la dimérisation des NBDs. Elle a également mis en évidence une cassure unique de l'hélice TM8, absente des autres transporteurs ABC, qui semble être à l'origine de l'évolution de CFTR vers une fonction de canal ionique.

3.Fonction de CFTR

CFTR joue un rôle essentiel non seulement dans la sécrétion des ions Cl^-, mais aussi dans la régulation du pH intracellulaire et le contrôle d'autres canaux ioniques (Schwiebert et al., 1999; Barriere et al., 2009) .

A. CFTR en tant que canal chlorure

CFTR agit comme un canal à ions chlorure, essentiel au transport transépithélial d'anions et à l'hydratation du mucus dans divers organes (Anderson et al., 1991 ; Gray, Plant et Argent, 1993 ; Hwang et Kirk, 2013). Sa perméabilité varie selon les ions (fluor < bicarbonate < iode <

Cl^- < brome < thiocyanates) et il participe à l'équilibre osmotique, au pH du mucus et à l'activité des enzymes antimicrobiennes (Quinton, 2008).

B. CFTR comme régulateur d'autres canaux ioniques

En plus d'être un canal, CFTR régule d'autres canaux ioniques par interactions directes ou indirectes. En cas de mutation (comme dans la mucoviscidose), cette régulation est altérée, entraînant des déséquilibres électrolytiques et une composition anormale du mucus.

C. Régulation du canal ORCC

CFTR active le canal ORCC via une cascade impliquant l'ATP et les récepteurs purinergiques P2R, bien que ni l'ATP, ni la PKA, ni la PKC n'activent ORCC directement (Schwiebert et al., 1995 ; Gabriel et al., 1993 ; Jovov et al., 1995 ; Schwiebert et al., 1998). L'interaction entre les domaines NBD1 et R de CFTR, et leur phosphorylation par la PKA, est cruciale pour cette régulation (Schwiebert et al., 1998 ; Baker et al., 2007).

D. Régulation du canal ENaC

CFTR inhibe le canal sodique ENaC, empêchant une réabsorption excessive de sodium et donc une déshydratation du mucus (Willumsen et Boucher, 1989). En cas de perte de fonction de CFTR, ENaC devient hyperactif, entraînant un mucus épais, propice aux infections chroniques (Stutts et al., 1995 ; Guggino et Stanton, 2006 ; Donaldson et Boucher, 2007).

E. Régulation d'autres canaux et rôles extra-pulmonaires

CFTR régule aussi d'autres canaux dans divers organes (pancréas, intestins, glandes salivaires, canaux biliaires), comme l'échangeur Cl-/HCO3- SLC26A6, selon des mécanismes encore partiellement compris. Leur dysfonctionnement explique les atteintes extrapulmonaires de la mucoviscidose (troubles digestifs, infertilité, atteintes hépatiques) (Madácsy et al., 2018).

F. Rôle dans les jonctions cellulaires

L'une des principales altérations observées dans la mucoviscidose, à l'échelle cellulaire, est la perte de la résistance transépithéliale au niveau de l'épithélium pulmonaire.

Cette diminution de la résistance traduit une désorganisation des complexes jonctionnels (tight junctions et gap junctions), qui forment normalement une barrière physique étanche entre la lumière des voies respiratoires et les tissus sous-jacents (Lee et al., 1999). La rupture de cette barrière facilite le passage de pathogènes, favorisant l'installation d'infections chroniques et l'exacerbation des réponses inflammatoires (Humlicek et al., 2007).

Des études récentes ont montré que la localisation membranaire de CFTR est cruciale pour le maintien de l'intégrité de cette barrière épithéliale (Saint-Criq & Gray, 2017). En effet, la restauration de la protéine CFTR à la membrane plasmique dans des cellules dépourvues de cette protéine (issues de patients atteints de mucoviscidose) permet de restaurer la résistance transépithéliale. À l'inverse, l'inhibition de CFTR par un inhibiteur spécifique, le CFTRinh-172, n'altère pas cette résistance, ce qui indique que ce n'est pas l'activité du canal CFTR qui est indispensable ici, mais bien la présence de la protéine à la membrane (LeSimple et al., 2010).

Cette fonction structurale est notamment assurée par le domaine PDZ de CFTR, qui lui permet d'interagir avec des protéines de la membrane telles que ZO-1 (Zonula Occludens-1), une protéine clé dans l'organisation des jonctions serrées. CFTR s'associe aussi à d'autres partenaires impliqués dans l'assemblage des complexes jonctionnels et la régulation des jonctions communicantes, contribuant ainsi à la cohésion et à la polarité des cellules épithéliales (Wang et al., 1998; Huang et al., 2003; Zahraoui, 2004).

Ainsi, CFTR ne joue pas uniquement un rôle fonctionnel en tant que canal ionique, mais aussi un rôle structural essentiel dans l'organisation et la stabilité des jonctions cellulaires, conditionnant l'intégrité de l'épithélium pulmonaire face aux agressions extérieures.

G. Rôle dans l'infection et l'inflammation

La protéine CFTR jouerait également un rôle crucial dans la défense immunitaire de l'épithélium respiratoire. Selon les travaux de Pier et collaborateurs, CFTR agirait comme un récepteur pour certaines bactéries pathogènes, notamment *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhi* (Pier et al., 1997). Cette interaction est fondamentale dans la réponse immunitaire initiale. En effet, lorsque *P. aeruginosa* se lie à CFTR à la surface des cellules épithéliales, cela déclenche une cascade de signaux cellulaires impliquant la Major Vault Protein (MVP).

Cette activation permet l'internalisation contrôlée de la bactérie, suivie de l'activation du facteur nucléaire NF-κB (Nuclear Factor kappa B), un acteur central dans l'induction de l'apoptose des cellules infectées afin de limiter la dissémination bactérienne (Campódonico et al., 2008).

Cependant, dans le cas de la mucoviscidose, où CFTR est absent ou dysfonctionnel, cette voie de défense est compromise. L'absence d'activation de NF-κB dans ce contexte empêche l'élimination efficace des cellules infectées, ce qui favorise la colonisation persistante par des pathogènes opportunistes comme *P. aeruginosa*. Ce mécanisme entretient une dynamique persistante d'inflammation et d'infections chroniques, caractéristique majeure de la physiopathologie de la mucoviscidose.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'absence de CFTR est aussi associée à une augmentation du stress oxydatif et à l'accumulation de métabolites réactifs toxiques. Notamment, une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des céramides a été observée (Pier et al., 1998; Schroeder et al., 2002; Cannon et al., 2003; Y. Zhang et al., 2010).

Ces molécules participent à l'inflammation chronique, à la perturbation des membranes cellulaires et à la progression des lésions tissulaires. L'excès de céramides, en particulier, semble jouer un rôle clé dans le dysfonctionnement immunitaire et l'aggravation des lésions pulmonaires (Becker et al., 2010; Petrache et al., 2011).

Ainsi, le déficit en CFTR dans la mucoviscidose ne perturbe pas uniquement l'hydratation du mucus, mais compromet aussi la réponse immunitaire innée, en augmentant la susceptibilité aux infections tout en alimentant une inflammation persistante et délétère dans les voies respiratoires.

Tableau 4 Profil des mutations CFTR les plus courantes *(Source Moskowitz et al.,2008)*
*a Calcul basé sur le nombre total d'allèles CFTR.**b** Voir**Figure 25**.**c** De nombreuses exceptions existent quant à la corrélation entre l'effet de la mutation et le phénotype clinique.*

Mutation	Relative frequency (%)[a]	Functional class[b]	Phenotype[c]
ΔF508	66.0	II	Classic
G542X	2.4	I	Classic
G551D	1.6	III	Classic
N1303K	1.3	II	Classic
W1282X	1.2	I	Classic
R553X	0.7	I	Classic
621+1G>T	0.7	I	Classic
1717−1G>A	0.6	I	Classic
R117H	0.3	IV	Nonclassic
R1162X	0.3	Not clear[d]	Classic

4. Mutations du gène CFTR

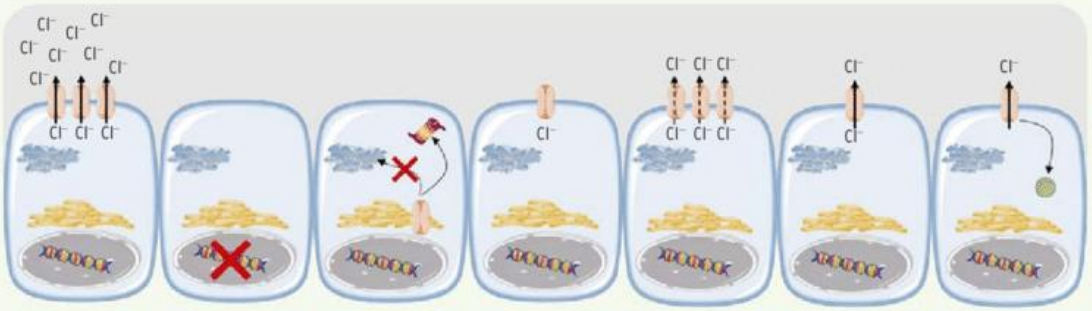
À ce jour, 2 121 mutations du gène CFTR ont été répertoriées (Anon, 2025). Parmi celles-ci, on retrouve majoritairement des mutations faux-sens (38,4 %), suivies par les modifications du cadre de lecture (16,17 %) et les variations de séquence (12,7 %). Ces mutations sont classées selon leur impact fonctionnel sur la protéine CFTR en six grandes classes (Kerem, 2006; Moskowitz et al., 2008) (**Tableau 4**).

Classification fonctionnelle des mutations CFTR

- **Classe I :** Cette classe regroupe les mutations qui entraînent une absence complète de la protéine CFTR. Elles provoquent souvent une mutation non-sens, un décalage du cadre de lecture ou une anomalie d'épissage, empêchant toute synthèse protéique fonctionnelle (**Figure 25**).
- **Classe II :** Ce type de mutation est le plus fréquent, et inclut notamment la mutation ΔF508 (ou Phe508del), qui correspond à la délétion d'une phénylalanine en position 508. Ces mutations causent un défaut de repliement et de glycosylation de la protéine, ce qui bloque son export du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi.

- La protéine mal repliée est reconnue comme anormale, elle est ubiquitinée puis dégradée par le protéasome (Kerem, 2006)(**Figure 25**).
- **Classe III** : Les mutations de cette classe perturbent la régulation de l'ouverture du canal CFTR. Bien que la protéine atteigne la membrane plasmique, elle est incapable de s'ouvrir correctement. Ces mutations affectent généralement les domaines de liaison à l'ATP ou les domaines NBD1/NBD2 (Anderson & Welsh, 1992) (**Figure 25**).
- **Classe IV :** Ces mutations touchent les domaines transmembranaires, ce qui altère la conductance ionique du canal. CFTR est bien exprimée à la membrane, mais son efficacité dans le transport d'ions est réduite (Sheppard et al., 1993) (**Figure 25**).
- **Classe V :** Les mutations de cette catégorie perturbent l'épissage de l'ARNm, entraînant une réduction du nombre de protéines CFTR fonctionnelles à la membrane. Cela diminue leur abondance sans altérer fondamentalement leur fonction (Highsmith et al., 1994; Zielenski & Tsui, 1995) (**Figure 25**).
- **Classe VI** : Souvent associée à la classe V, elle regroupe les mutations qui affectent la stabilité de CFTR à la membrane. Ces anomalies concernent en particulier l'extrémité C-terminale, essentielle pour le maintien de la protéine en surface (Haardt et al., 1999) (***Figure 25***).

Les formes cliniques les plus sévères de la mucoviscidose sont généralement associées aux classes I, II et III, car elles compromettent fortement ou totalement la fonction du canal CFTR. À l'inverse, les classes IV, V et VI donnent lieu à des formes plus modérées, bien que chroniques (Férec, 2021).



CFTR sauvage	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5	Classe 6
Type de défauts	Ø protéine	Ø trafic	Ø fonction	Diminution de la fonction	Moins de protéines	Moins stable
Exemples de mutations	p.Gly542* p.Arg553* p.Trp1282*	p.Gly85Glu p.Ile507del **p.Phe508del** p.Asn1303Lys	p.Val520Phe p.Ser549Arg p.Gly551Asp	p.Arg117His p.Arg334Trp P;Ser1235Arg	p.Arg455Glu c.1680-886A>G c.2657+5G>A	Résiduel p.Phe508del p.Gln1412*
Approches requises	Restaurer la synthèse protéique	Corriger le repliement de la protéine	Restaurer la conductance du canal	Restaurer la conductance du canal	Maturation/ Correction de l'épissage	Favoriser la stabilité protéique

***Figure 25 Représentation des six classes fonctionnelles de mutations du gène CFTR**. (Source : Férec.,2021)*
Les mutations les plus fréquentes sont indiquées pour chaque classe, avec leur impact principal sur l'expression, le repliement, la localisation ou la fonction de la protéine CFTR. Les stratégies thérapeutiques ciblées sont également précisées en fonction du défaut moléculaire identifié.

a. Atteintes cliniques multiviscérales

La mucoviscidose étant une maladie multiviscérale, la perte de fonction de CFTR affecte ainsi plusieurs organes, en particulier :Les poumons, avec des troubles de la clairance mucociliaire menant à des infections chroniques et à une inflammation persistante ;Le pancréas exocrine, provoquant une insuffisance pancréatique avec malabsorption des graisses et des protéines ; Les intestins, avec un risque d'occlusion néonatale (iléus méconial), de constipation sévère ou de prolapsus rectal ; Le système uro-génital, notamment avec une azoospermie obstructive fréquente chez les hommes due à l'absence congénitale des canaux déférents ; Le système hépatobiliaire, par l'obstruction des canaux biliaires pouvant entraîner une cholangite sclérosante ;Et enfin, des manifestations vasculaires et métaboliques peuvent apparaître à un stade plus avancé.

Malgré l'identité génétique des mutations dans certains cas, les phénotypes peuvent varier d'un individu à l'autre, en raison de facteurs épigénétiques, environnementaux ou de polymorphismes modificateurs (Butnariu et al., 2021). Toutefois, l'évolution naturelle de la mucoviscidose est souvent progressive, avec l'aggravation des atteintes au fil du temps, en particulier au niveau pulmonaire.

b. Atteintes du système uro-génital

L'atteinte du système uro-génital est fréquente chez les hommes atteints de mucoviscidose. Elle se manifeste le plus souvent par une azoospermie obstructive, liée à une obstruction ou une absence des canaux déférents. Cette obstruction résulte d'une accumulation de mucus épais au cours du développement embryonnaire, entraînant une dégénérescence des canaux déférents et une stérilité fonctionnelle malgré une spermatogenèse souvent intacte (Cuppens & Cassiman, 2004; de Souza et al., 2018). En effet, près de 95 % des hommes atteints de mucoviscidose présentent une absence congénitale bilatérale des canaux déférents (CBAVD – Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens), qui constitue un phénotype génital atypique de la maladie (Chillón et al., 1995; de Souza et al., 2018; Dumur et al., 1996). Le CBAVD est fortement associé à certaines mutations et variants du gène CFTR, notamment la mutation F508del et les polymorphismes de l'intron 9 (5T, TG12/13, M470V), dont les combinaisons influencent l'expression phénotypique (Dumur et al., 1996; de Souza et al., 2018). Ces données expliquent pourquoi certains patients présentent uniquement une infertilité masculine isolée sans atteinte pulmonaire ou pancréatique marquée. Le diagnostic de CBAVD doit donc s'accompagner d'un dépistage génétique CFTR et d'un conseil génétique, en particulier avant toute assistance médicale à la procréation (ICSI).

Chez les femmes, une hypofertilité est fréquemment rapportée, sans pour autant entraîner une stérilité systématique. Cette diminution de fertilité est due à l'épaississement du mucus cervical, qui entrave la migration des spermatozoïdes, et à un déséquilibre des ions bicarbonates, qui altère le pH optimal nécessaire à la survie et la motilité des spermatozoïdes (Ahmad et al., 2013).

c. Atteintes du système digestif

Les manifestations digestives sont parmi les premiers signes cliniques identifiés historiquement dans la mucoviscidose. Elles concernent principalement le pancréas et le système hépatobiliaire (Sabharwal, 2016).

d. Pancréas

Environ 85 % des patients atteint de la mucoviscidose développent une insuffisance pancréatique exocrine, souvent associée à une fibrose progressive du tissu pancréatique (Gibson-Corley, Meyerholz et Engelhardt, 2016). En situation normale, CFTR permet l'hydratation des sucs pancréatiques et la régulation du pH, facilitant l'activation et le transport des enzymes digestives dans le duodénum. En cas d'absence ou de dysfonctionnement de CFTR, les sécrétions deviennent plus visqueuses et acides, empêchant leur évacuation (Madácsy et al., 2018). Cette stagnation entraîne une obstruction des canaux pancréatiques, une auto-digestion des tissus et l'apparition d'une fibrose.

Lorsque cette fibrose atteint les îlots de Langerhans, elle peut provoquer un diabète de type 1-insulinodépendant, plus précisément appelé diabète lié à la mucoviscidose (*Cystic Fibrosis Related Diabetes*, CFRD), un phénotype mixte entre diabète de type 1 et type 2 (Nick & Nichols, 2016).

e. Système hépatobiliaire

Les atteintes hépato-biliaires, bien que moins fréquentes, peuvent être graves, voire mortelles. CFTR joue un rôle dans l'hydratation de la bile et la régulation de son pH. Son absence provoque une accumulation de bile épaisse dans les canalicules biliaires, favorisant la destruction des cellules hépatiques, une inflammation chronique, une production de ROS (espèces réactives de l'oxygène), et une fibrose hépatique progressive, qui peuvent évoluer vers une cirrhose biliaire (Leeuwen et al., 2014).

f. Atteintes du système respiratoire

L'atteinte respiratoire est la manifestation la plus fréquente et la plus grave de la mucoviscidose, responsable d'environ 60 % des décès (Flume, 2009; Ratjen et al., 2015). Les cellules épithéliales bronchiques humaines (HBE), qui forment l'épithélium pseudostratifié des voies respiratoires, jouent un rôle central dans la protection pulmonaire. Elles assurent une barrière physique contre les agents pathogènes grâce à différents types cellulaires spécialisés : les cellules basales, à fonction de soutien et de régénération ; les cellules caliciformes, sécrétrices de mucus ; et les cellules ciliées, responsables du transport de ce mucus. Ces cellules sont reliées entre elles par des jonctions serrées, adhérentes et desmosomales, garantissant l'étanchéité et la cohésion de la barrière épithéliale (Bals & Hiemstra, 2004).

Cette barrière est renforcée par un système de défense inné essentiel à la protection de l'épithélium : la clairance mucociliaire. Le mucus, produit par les cellules caliciformes, piège les particules inhalées et les micro-organismes, tandis que les battements rapides et coordonnés des cils déplacent ce mucus vers le pharynx pour permettre son évacuation (Puchelle et al., 1983; Sears et al., 2013) . Ce mécanisme repose sur une fine couche de liquide périciliaire, dont la composition et l'épaisseur sont maintenues par des flux ioniques transépithéliaux (**Figure 26**). Ce liquide facilite le mouvement des cils et contient également des agents antimicrobiens, tels que le lysozyme, ainsi que des antiprotéases, qui contribuent à la protection de l'épithélium (Bals & Hiemstra, 2004; Tarran, 2004).

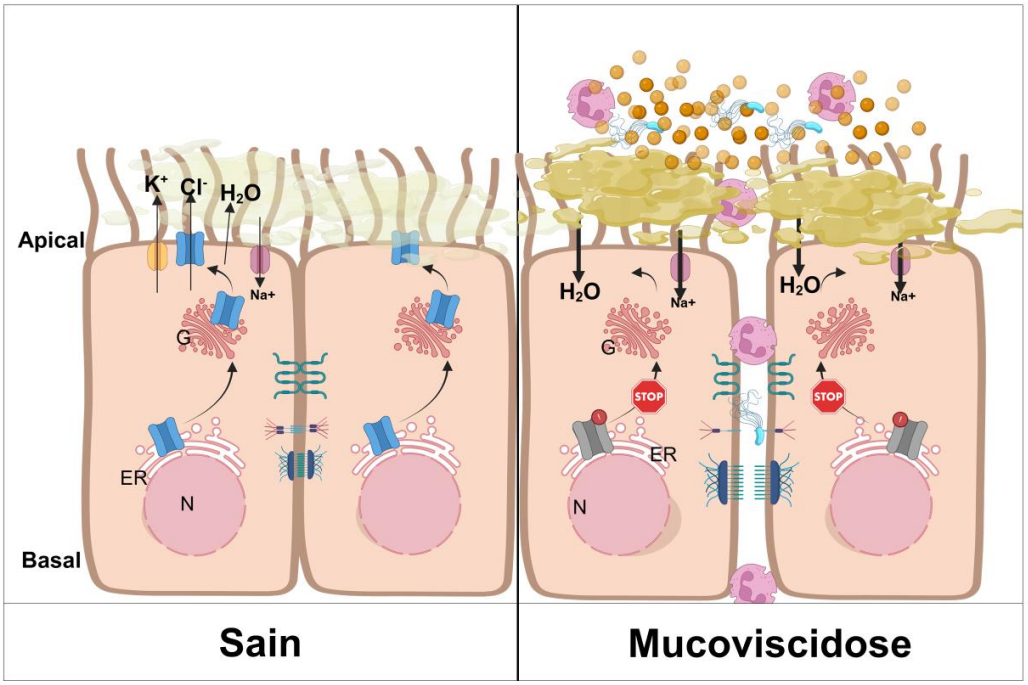


Figure 26 Altération de la fonction de CFTR dans l'épithélium bronchique chez les patients atteints de mucoviscidose
Représentation schématique comparant les cellules épithéliales bronchiques dans des conditions normales (à gauche) et dans un contexte de mucoviscidose (à droite).Dans les cellules saines, la protéine CFTR correctement repliée (en bleu) est transportée à la membrane apicale, où elle permet l'efflux de Cl^- et contribue à l'hydratation du mucus via un transport couplé de Na^+ et H_2O.Dans la mucoviscidose, la mutation F508del de CFTR entraîne un défaut de repliement et une rétention dans le réticulum endoplasmique (ER), empêchant son adressage membranaire. L'absence de CFTR fonctionnel provoque une réabsorption excessive de Na^+, une déshydratation du mucus, son accumulation, et favorise l'infiltration de cellules immunitaires (neutrophiles), entraînant une inflammation chronique.G : Golgi ; N : noyau ; ER : réticulum endoplasmique. Figure réalisée avec BioRender.

Dans la mucoviscidose, le dysfonctionnement de la protéine CFTR perturbe ces mécanismes. Le transport des ions est altéré, entraînant un déséquilibre osmotique au sein de l'épithélium respiratoire. Cela conduit à une déshydratation du mucus, qui devient plus visqueux, entravant le battement ciliaire et ralentissant la clairance mucociliaire (Lopes-Pacheco, 2016).

Par ailleurs, le défaut d'excrétion des ions bicarbonates abaisse le pH du mucus, créant un environnement acide favorable à la colonisation bactérienne, notamment par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Cette situation favorise l'émergence de complications telles que l'asthme ou des infections pulmonaires chroniques (Dickinson & Collaco, 2021).

À long terme, l'inflammation persistante causée par ces infections contribue au remodelage des voies aériennes et à la fibrose pulmonaire, entraînant une réduction progressive de la capacité respiratoire. Cette fibrose constitue la principale cause d'insuffisance respiratoire terminale, pouvant nécessiter une transplantation pulmonaire. Parmi les autres complications, on retrouve les pneumothorax (environ 3,4 % des patients), liés à la rupture d'alvéoles pulmonaires. L'air s'accumule alors dans la cavité pleurale, comprimant les poumons et compromettant la respiration (Ward & Hunninghake, 1998; Flume et al., 2005).

g. Le système vasculaire

L'atteinte vasculaire constitue une complication importante, souvent liée aux atteintes pulmonaires dans la mucoviscidose. Une hémoptysie (saignement des voies respiratoires) survient chez environ 3 % des patients atteints (Buehler et al., 2012). Plusieurs dysfonctionnements vasculaires ont été observés chez ces patients, notamment une augmentation de la rigidité et de la perméabilité des artères pulmonaires, ce qui aggrave la dysfonction respiratoire (Kuo et al., 2017; Totani et al., 2017; Wielpütz et al., 2014).

Les cellules endothéliales dans la mucoviscidose

Les cellules endothéliales, qui tapissent la paroi interne des vaisseaux sanguins, expriment normalement la protéine CFTR fonctionnelle (Khalaf et al., 2020). Cependant, dans la mucoviscidose, ces cellules sont aussi affectées par la mutation ou l'absence de CFTR.

Au niveau pulmonaire, l'absence de CFTR provoque une défaillance de la barrière endothéliale, ce qui conduit à la formation d'œdèmes et à une augmentation des marqueurs inflammatoires (**Figure 27**). De plus, il y a une surexpression des molécules d'adhésion cellulaire, favorisant la migration leucocytaire et l'inflammation chronique (Brooks et al., 2019; De Rose et al., 1998; Downey et al., 2009; Goyal et al., 2019; Declercq et al., 2020; Erfinanda et al., 2022; Amoakon et al., 2024).

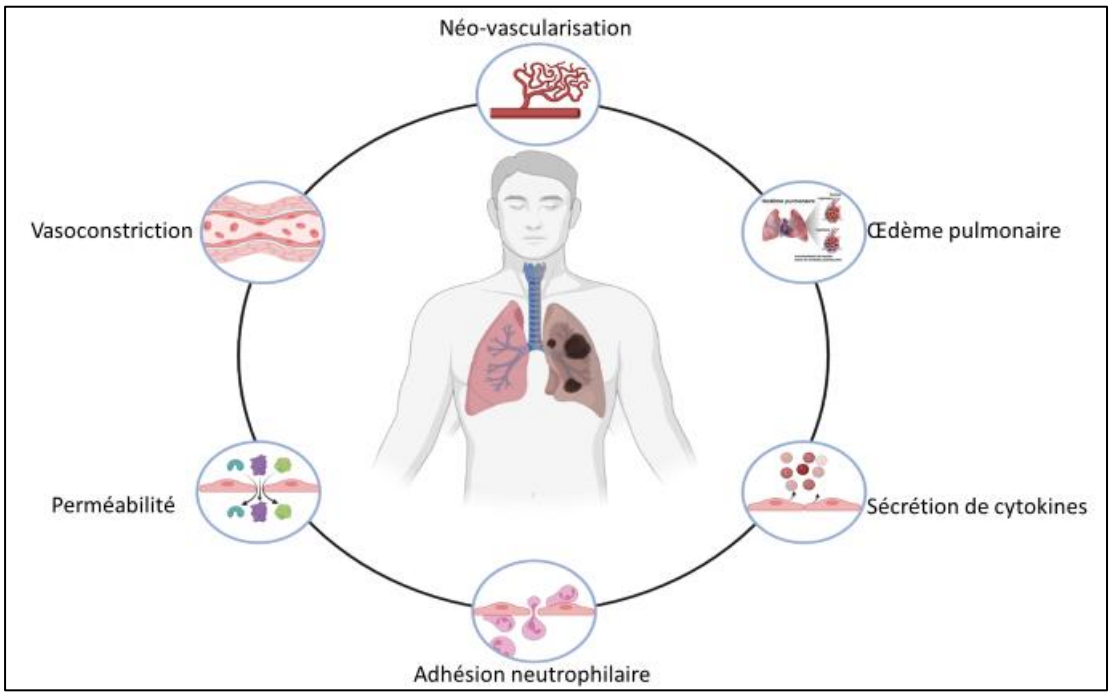


Figure 27 Dysfonction vasculaire pulmonaire induite par l'inflammation chronique

CFTR dans les cellules endothéliales macro- et microvasculaires

On distingue deux grandes populations de cellules endothéliales : les cellules macrovasculaires, présentes dans les gros vaisseaux, et les cellules microvasculaires, situées dans les capillaires et petits vaisseaux. L'impact de la mutation CFTR varie selon le type cellulaire.

Cellules endothéliales microvasculaires : L'absence de CFTR des cellules endothéliales du microvaisseau entraîne une augmentation de la perméabilité endothéliale, avec la formation de fibres de stress cytosquelettiques et d'espaces intercellulaires (gaps). Ces altérations perturbent la cohésion de la barrière vasculaire (Totani et al., 2017). Les recherches menées par le Dr Khalaf ont montré que la présence constitutive de CFTR dans les cellules endothéliales microvasculaires est faible, mais qu'elle augmente en réponse à un inhibiteur de CFTR. Cette observation suggère une régulation adaptative de l'expression de CFTR dans ces cellules. Par ailleurs, l'inhibition de CFTR favorise la sécrétion de la cytokine inflammatoire IL-8, contribuant ainsi à l'état inflammatoire local (Khalaf et al., 2020).

Cellules endothéliales macrovasculaires : L'absence de CFTR des cellules endothéliales du macrovaisseau cause une augmentation intracellulaire du sphingosine-1-phosphate (S1P), un lipidomédiateur qui agit comme stabilisateur des jonctions adhérentes et joue un rôle clé dans la régulation de la perméabilité vasculaire (Brown et al., 2014).

Des études sur des cellules endothéliales ombilicales humaines (HUVEC) ont montré une diminution de l'expression des protéines de jonction (telles que les jonctions serrées et adhérentes), ainsi qu'une baisse de la production d'oxyde nitrique, molécule directement impliquée dans la vasodilatation vasculaire. Ces altérations affectent négativement la capacité des vaisseaux à se relaxer, contribuant à une dysfonction vasculaire majeure (Erfinanda et al., 2022; Khalaf et al., 2020; Totani et al., 2017).

Facteurs de régulation de l'endothélium mucoviscidosique

La mucoviscidose est une maladie génétique causée principalement par la mutation ΔF508 du gène CFTR, qui entraîne une inflammation chronique des bronches. Cette inflammation s'accompagne d'une augmentation de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, un processus appelé angiogenèse, qui participe au remodelage des tissus pulmonaires et à la progression de la maladie (Amoakon et al., 2024) Parmi les facteurs majeurs qui contrôlent ce processus, le VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) joue un rôle central en stimulant la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales (Ferrara et al., 2003). Chez les patients atteints de maladies respiratoires chroniques comme la mucoviscidose ou la fibrose pulmonaire, une néoangiogenèse aberrante a été observée, souvent désorganisée et peu fonctionnelle, contribuant à l'hypoxie locale, à l'aggravation de l'inflammation et au remodelage tissulaire (Amano et al., 2021). Restaurer une signalisation endothéliale équilibrée représente donc un levier thérapeutique prometteur, susceptible de stabiliser la barrière vasculaire, de limiter les fuites capillaires et d'interrompre le cercle vicieux inflammatoire. Très récemment, de nouveaux facteurs ont été reportés comme acteurs potentiels de ce processus. Il s'agit de petites protéines appelées prokinéticines, notamment l'EG-VEGF (ou PROK1) et BV8 (ou PROK2). Ces protéines agissent en se fixant sur leurs récepteurs spécifiques, PROKR1 et PROKR2, et jouent un rôle important, non seulement dans la formation des vaisseaux, mais aussi dans l'activation et le recrutement de cellules du système immunitaire, participant ainsi à la réponse inflammatoire.

Thérapies ciblant CFTR

Jusqu'au début des années 2010, la prise en charge de la mucoviscidose reposait exclusivement sur des traitements symptomatiques : antibiothérapie pour lutter contre les infections pulmonaires, kinésithérapie respiratoire pour améliorer la clairance mucociliaire, enzymes pancréatiques de substitution et supplémentation nutritionnelle. Ces stratégies, bien qu'indispensables, ne corrigeaient pas le défaut moléculaire primaire. L'avènement des

modulateurs de CFTR a profondément transformé la prise en charge, en proposant pour la première fois une correction directe de la protéine défectueuse (Goetz & Savant, 2021).

Impact des modulateurs sur la structure et la fonction de CFTR

La mutation F508del illustre la complexité des anomalies structurales du CFTR : instabilité du domaine NBD1, défaut d'interaction NBD1–ICL4 et dégradation accélérée par la machinerie de contrôle qualité. Les correcteurs visent à améliorer le repliement et la stabilité de la protéine, tandis que les potentiators stabilisent la conformation ouverte du canal. Les structures cryo-EM récentes ont montré que des molécules comme ivacaftor ou GLPG1837 se lient dans une poche transmembranaire située à l'interface TM4–TM5–TM8, favorisant la probabilité d'ouverture du canal (Liu et al., 2019). Ainsi, les modulateurs n'entraînent pas de changement tridimensionnel radical, mais modifient subtilement l'équilibre énergétique entre états fermés et ouverts, corrigeant la dynamique conformationnelle du canal (Molinski et al., 2012).

De plus, des études fonctionnelles ont montré que l'activité structurale de CFTR influence la physiologie cellulaire au-delà du transport ionique. Veit et al. (2012) ont démontré que la restauration d'un CFTR fonctionnel réduit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les cultures bronchiques humaines, un effet absent avec des mutants non conductants comme G551D (Veit et al., 2012). Cela souligne que les modulateurs, en rétablissant la conformation active du canal, contribuent non seulement à l'hydratation du mucus mais aussi au contrôle du tonus inflammatoire de l'épithélium respiratoire.

Ivacaftor : premier modulateur et preuve de concept

Ivacaftor (VX-770) a marqué un tournant en 2012 en devenant le premier modulateur approuvé par la FDA. Il cible les mutations de type gating, comme G551D, qui représentent une classe III de mutations caractérisées par une ouverture défectueuse du canal. Ivacaftor augmente la probabilité d'ouverture (open probability, Po) de CFTR et améliore significativement la conductance au chlore. Dans les essais cliniques, il a entraîné une baisse du chlore sudoral, une augmentation du VEMS, une amélioration de la croissance et de la qualité de vie, ainsi qu'une réduction des exacerbations pulmonaires (Goetz & Savant, 2021; Ramsey et al., 2011). L'indication d'ivacaftor a été progressivement élargie à d'autres mutations de gating et de fonction résiduelle. De plus, chez l'enfant, ce traitement a montré des bénéfices extrapulmonaires notables, notamment sur la fonction pancréatique et la croissance (Regard et al., 2022).

Correcteurs de CFTR et doubles combinaisons

L'efficacité d'ivacaftor étant limitée à moins de 5 % des patients, le développement de correcteurs visait à traiter la mutation F508del, la plus fréquente dans la mucoviscidose. Les correcteurs facilitent le repliement de la protéine et son trafic jusqu'à la membrane plasmique. La première combinaison, lumacaftor/ivacaftor (Orkambi), a été approuvée en 2015 pour les patients homozygotes F508del. Elle a montré une amélioration modeste du VEMS et une réduction du taux d'exacerbations, mais son utilisation est limitée par des effets indésirables respiratoires fréquents (bronchospasmes, dyspnée) et de nombreuses interactions médicamenteuses (Goetz & Savant, 2021). Tezacaftor/ivacaftor (Symkevi), plus récente et mieux tolérée, a montré une efficacité similaire avec un meilleur profil de tolérance, ce qui en a fait une alternative intéressante, notamment chez les patients hétérozygotes F508del avec une mutation résiduelle (Regard et al., 2022).

La triple combinaison ETI : un tournant majeur.

La mise au point de la triple thérapie elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI, commercialisée sous les noms Kaftrio ou Trikafta) a marqué un changement radical dans le traitement de la mucoviscidose. Approuvée en 2019, elle associe deux correcteurs complémentaires (tezacaftor et elexacaftor) à un potentiator (ivacaftor), permettant de traiter les patients porteurs d'au moins une mutation F508del. Dans les essais cliniques, ETI a entraîné une amélioration spectaculaire de la fonction respiratoire, avec une augmentation moyenne de 14 % du VEMS (ppFEV1), une réduction de plus de 60 % des exacerbations pulmonaires et une amélioration significative de la qualité de vie (Heijerman et al., 2019; Middleton et al., 2019). Les données en vie réelle confirment ces résultats. En France, environ 82 % des patients sont aujourd'hui éligibles à cette combinaison, et les registres nationaux montrent une amélioration durable de la fonction pulmonaire, de l'état nutritionnel et de la survie (Regard et al., 2022). En outre, une étude danoise récente a mis en évidence une réduction significative de la prévalence des pathogènes pulmonaires tels que Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus et Aspergillus spp. après trois ans de traitement, bien que certains patients demeurent colonisés (Bendixen et al., 2025).

Effets extrapulmonaires des modulateurs

Les effets bénéfiques des modulateurs dépassent le seul compartiment pulmonaire. Concernant le métabolisme glucidique, le diabète lié à la mucoviscidose (CFRD) demeure une complication fréquente, touchant plus de 50 % des patients adultes. Les modulateurs semblent améliorer indirectement l'homéostasie glucidique. Ivacaftor favorise la sécrétion d'insuline et régule le glucagon chez les porteurs de mutations de gating, alors que les effets du

lumacaftor/ivacaftor sont plus variables. La triple thérapie ETI réduit modestement l'HbA1c et la glycémie à jeun, sans impact majeur sur la sécrétion d'insuline (Giordano et al., 2025).

Les effets digestifs sont également notables. Dans un modèle pancréatique F508del, ETI a permis de restaurer la conductance épithéliale, le pH du fluide apical et de réduire la viscosité du mucus, même en condition pro-inflammatoire (Ludovico & Baroni, 2025). Ces données confirment que la restauration fonctionnelle de CFTR par modulateurs s'étend au pancréas et aux glandes exocrines.

Enfin, au niveau de l'épithélium, la perte de CFTR favorise la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et l'altération des jonctions serrées. Des études in vitro montrent que les modulateurs corrigent partiellement ce défaut en restaurant l'expression de marqueurs épithéliaux tels que la claudine-1 et en réduisant le phénotype mésenchymateux (Rodrigues et al., 2025).

Données en vie réelle et limites

Les études de cohorte en France et ailleurs en Europe confirment l'efficacité clinique des modulateurs, mais mettent aussi en lumière certaines limites. La réponse thérapeutique est hétérogène selon les individus, influencée par des facteurs génétiques modificateurs, l'état inflammatoire ou la présence de comorbidités (Regard et al., 2022). Par ailleurs, environ 10 à 15 % des patients restent inéligibles aux modulateurs, notamment ceux porteurs de mutations rares non corrigées par les molécules actuelles. Les effets indésirables incluent des atteintes hépatiques, cutanées et psychiatriques. Enfin, le coût très élevé de ces traitements soulève d'importants enjeux d'équité et d'accès aux soins (Goetz & Savant, 2021).

La mucoviscidose et les prokinéticines

Des études publiées par notre groupe ont démontré que dans les bronches de patients atteints de mucoviscidose avec la mutation ΔF508, l'expression des gènes codant pour EG-VEGF, BV8 et PROKR2 est multipliée par environ cinq, quatre et deux fois, respectivement, comparée à leur expression chez les sujets sains (Chauvet et al., 2015). Cette surproduction de prokinéticines s'accompagne d'une sécrétion accrue d'EG-VEGF par les cellules de l'épithélium bronchique. Cette production est d'autant plus importante lorsque l'activité du canal CFTR inhibée (Chauvet et al., 2015).

Par ailleurs, ces protéines favorisent l'augmentation des niveaux du cAMP intracellulaire et la mobilisation du calcium, suggérant un rôle potentiel compensatoire pour ces facteurs dans le rétablissement de la fonction du CFTR dans la pathologie de la mucoviscidose.

Le rôle établi des prokinéticines dans la modulation de l'inflammation et de l'angiogenèse suggère que ces facteurs pourraient être impliqués dans les mécanismes pathogéniques et représenter des leviers intéressants pour de nouvelles approches thérapeutiques.

Objectifs de la thèse

Objectifs

La mucoviscidose (MV) est une maladie génétique autosomique récessive qui touche environ 1 naissance sur 2500 en Europe. Elle est causée par des mutations du gène *CFTR*, codant une protéine transmembranaire impliquée dans le transport des ions chlorure (Cl^-) et bicarbonate (HCO_3^-) à travers la membrane apicale des cellules épithéliales.

Plus de 2000 mutations ont été identifiées sur le gène CFTR. La mutation F508del, présente chez environ 85 % des patients (homo- ou hétérozygotes), induit un défaut de repliement de CFTR, entraînant son blocage au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et sa dégradation prématurée. La protéine CFTR-dF508, bien qu'elle conserve une activité partielle, est absente ou faiblement exprimée à la membrane apicale des cellules épithéliales. Cette déficience altère l'hydratation du mucus et perturbe la clairance mucociliaire des voies aériennes, favorisant ainsi leur colonisation par des bactéries opportunistes telles que *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Cette infection des voies aériennes est accompagnée d'une inflammation locale précoce, détectable avant même la présence de pathogènes, suggérant une implication directe de la protéine CFTR dans la régulation de la réponse immunitaire. Les cellules épithéliales bronchiques mutées adoptent un phénotype pro-inflammatoire marqué par une production accrue de cytokines (IL-6, IL-8, TNF-α), de chémokines, et de métalloprotéases, favorisant le recrutement massif de neutrophiles. Ces derniers aggravent l'inflammation et les lésions par la libération d'enzymes et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), alimentant un cercle vicieux inflammation-lésions-recrutement.

L'inflammation du tissu épithélial pulmonaire active l'endothélium microvasculaire, favorisant le passage massif de neutrophiles. Ces cellules aggravent la réponse inflammatoire et accélèrent la destruction du tissu pulmonaire, menant à une insuffisance respiratoire. Contrôler cette infiltration au niveau endothélial permettrait de limiter les dommages, préserver l'épithélium et soutenir sa régénération. Ainsi, il est essentiel de comprendre la communication moléculaire entre l'épithélium et l'endothélium pulmonaire pour bien cibler la stratégie thérapeutique anti-inflammatoire.

Aujourd'hui, plusieurs molécules correctrices de l'adressage intracellulaire, de l'activité canal Cl^-, et de la stabilité membranaire du CFTR-dF508 sont utilisées pour traiter les patients atteints de mucoviscidose.

Lorsqu'elles sont combinées, ces thérapies améliorent significativement la qualité de vie des patients. Toutefois, leurs effets sur la réponse inflammatoire restent limités.

Ces observations suggèrent que le simple rétablissement de la sécrétion des ions Cl^-, par la relocalisation de la protéine CFTR-dF508 à la membrane plasmique, ne suffit pas à corriger l'inflammation chronique observée dans la maladie. Nous formulons l'hypothèse qu'il est essentiel de considérer le tissu épithélial en interaction étroite avec son microenvironnement immédiat, en particulier l'endothélium. D'autant plus que, chez les patients atteints de mucoviscidose, une néovascularisation microvasculaire a été mise en évidence, dans laquelle les facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF, jouent un rôle central.

Notre équipe, a mis en évidence l'implication d'un autre facteur pro-angiogénique ; Prokineticine-1 (PROK-1), aussi connu sous le nom de EG-VEGF, dans la mucoviscidose. Il se trouve que ce facteur circulant, qui agit via deux récepteurs ; PROKR1/PROKR2, a aussi des effets pro-inflammatoires. Il était donc logique d'étudier ce facteur dans le contexte physiologique et pathologique au niveau du tissu épithélial et endothélial sains et atteints de mucoviscidose **(Figure 28)**.

Ainsi, l'objectif de ma thèse a porté sur deux axes (**Figure 29**) :

Axe1 : Rôle de la conformation de CFTR dans la régulation de l'inflammation épithéliale

Évaluer dans quelle mesure la correction pharmacologique de CFTR-F508del permet de restaurer un phénotype anti-inflammatoire, et déterminer si la simple restauration de la fonction canal est suffisante ou si la conformation native de CFTR est indispensable pour moduler la réponse inflammatoire.

Objectifs spécifiques :

- Comparer les effets de modulateurs du CFTR-dF508 (lumacaftor, tezacaftor, elexacaftor) à l'expression de CFTR sauvage (CFTR-wt) sur l'expression, la stabilité conformationnelle et la fonction canal dans des cellules bronchiques mucoviscidosiques (CFBE-dF).
- Analyser la réponse inflammatoire (production et sécrétion de cytokines : IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα, IL-17A/F/E) dans ces modèles, sans stimulus infectieux, pour isoler les effets intrinsèques de CFTR.
- Évaluer la conformation de CFTR corrigée par des tests de résistance aux protéases, et la comparer à celle du CFTR-wt, afin de déterminer si des défauts de repliement résiduels sont associés à un maintien de l'inflammation.
- Tester l'hypothèse selon laquelle seule une conformation native de CFTR permet une régulation fine de l'inflammation, au-delà du rétablissement de la conductance ionique.

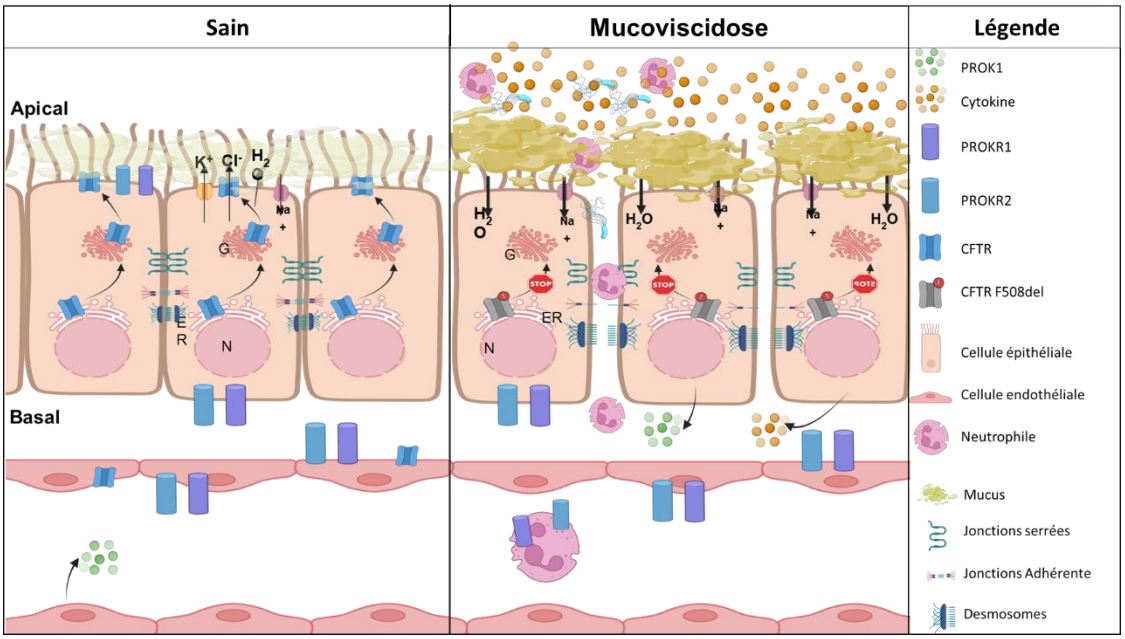


Figure 28 Altération conformationnelle de CFTR et impact de PROK1 : deux axes complémentaires dans la dérégulation inflammatoire pulmonaire au cours de la mucoviscidose

Représentation schématique intégrée des deux axes explorés au cours de la thèse. A gauche (condition saine), le canal CFTR correctement replié est inséré à la membrane apicale des cellules épithéliales, assurant le transport de Cl^- et l'hydratation du mucus. Cette homéostasie ionique limite la production de cytokines pro-inflammatoires, et l'endothélium sous-jacent reste non activé. A droite (mucoviscidose), la mutation F508del entraîne un défaut de repliement de CFTR, sa rétention dans le réticulum endoplasmique (ER) et son absence à la membrane, induisant une sécrétion accrue de cytokines, un recrutement neutrophilique massif et une activation de l'endothélium microvasculaire. Le facteur PROK1 (EG-VEGF), surexprimé dans ce contexte, exacerbe la perméabilité endothéliale et la transmigration leucocytaire, aggravant la réponse inflammatoire. Cette figure illustre l'hypothèse selon laquelle la conformation de CFTR et le microenvironnement endothélial, modulé par PROK1, participent conjointement à l'inflammation chronique dans la mucoviscidose.

ER : réticulum endoplasmique ; N : noyau ; G : Golgi. Figure réalisée avec BioRender.

Axe 2 – Rôle de PROK1 dans l'altération de la barrière endothéliale et l'inflammation pulmonaire

Explorer comment PROK1 contribue à l'altération de la barrière endothéliale pulmonaire et à la réponse inflammatoire des cellules HPMEC, indépendamment du statut de CFTR.

Objectifs spécifiques :

- Caractériser l'expression de PROK1 et de ses récepteurs (PROKR1/2) dans les cellules endothéliales pulmonaires humaines (HPMEC), au repos et sous stimulation inflammatoire.
- Étudier les effets de PROK1, du LPS et du Cytomix sur la prolifération, la migration et la structuration vasculaire des HPMEC.

➢ Mesurer la perméabilité endothéliale et la transmigration de neutrophiles-like (HL60 différenciés) en présence ou absence de PROK1, pour évaluer ses effets directs sur l'homéostasie vasculaire.

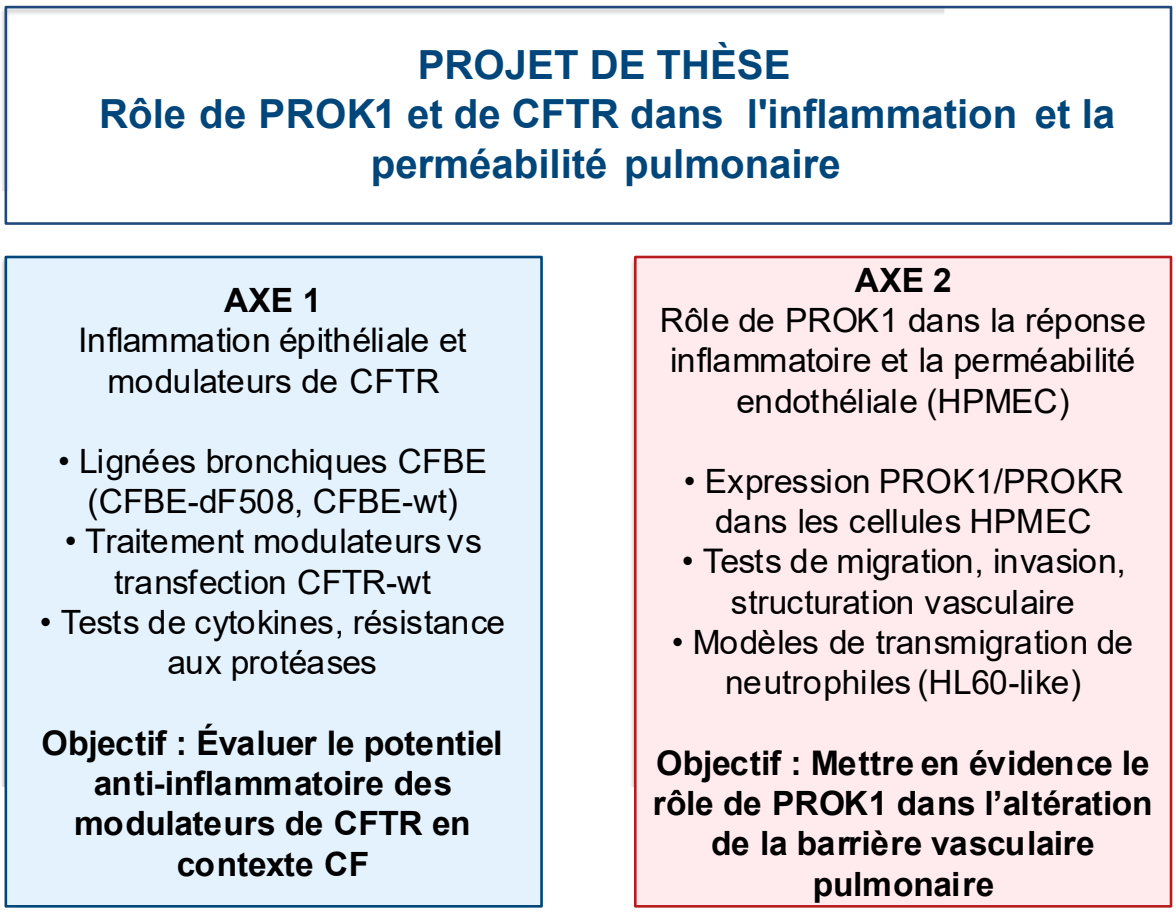


Figure 29 Les différents axes abordés au cours de ma thèse

L'ensemble des résultats obtenus vont faire l'objet de deux publications :

1. **Camille Lyko**, Amal Kouadri, Johanna Cormenier, Kevin Gemy, Nadia Alfaidy, and Mohamed Benharouga. Non-Infectious Inflammatory Response in CF Airway Epithelial Cells: A Comparative Study of Modulators and Wild-Type CFTR Rescue. (***Soumis à Frontiers in Pharmacology***)

2. **Camille Lyko**, Mélanie Boudaud, Nicolas Lemaitre, Martial Delion, Johanna Cormenier, Kevin Gemy, Nadia Alfaidy, and Mohamed Benharouga. PROK1 Enhances Leukocyte Transmigration and Barrier Disruption in Pulmonary Endothelial Cells During Inflammation. (***En préparation pour soumission***)

Résultats

Article 1

Introduction

La mucoviscidose (MV) est une maladie génétique, autosomique et récessive, qui affecte principalement le système respiratoire, digestif et reproducteur. Elle est causée par des mutations du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), qui code une glycoprotéine transmembranaire localisée au pôle apical des cellules épithéliales (Rowe et al., 2005). Cette protéine joue un rôle essentiel en tant que canal ionique, permettant le passage des ions chlorures (Cl^-) et bicarbonates (HCO_3^-), et est régulée par phosphorylation via les protéines kinases A et C (PKA et PKC). Elle contribue également à la régulation d'autres canaux impliqués dans l'homéostasie ionique et hydrique du mucus, indispensable au bon fonctionnement de nombreux organes (Linsdell, 2006).

À ce jour, plus de 2000 mutations du gène *CFTR* ont été identifiées (www.genet.sickkids.on.ca ; www.CFTR2.org) et classées en fonction de leur impact sur la synthèse, le trafic intracellulaire, la stabilité et la fonction de la protéine (Kerem, 2006; Ranganathan et al., 2017). La mutation la plus fréquente est F508del (dF508), correspondant à la délétion du résidu phénylalanine en position 508. Cette anomalie entraîne un mauvais repliement de la protéine CFTR au cours de sa biosynthèse dans le réticulum endoplasmique (RE) (M. Zeng et al., 2017). Reconnu comme défectueuse, CFTR-F508del est rapidement ciblée par le système de dégradation associé au réticulum endoplasmique (RE) (ERAD ; Endoplasmic Reticulum Associted Degradation) et éliminée via la voie ubiquitine/protéasome, avant même d'atteindre la membrane plasmique (Benharouga et al., 2001). Lorsqu'elle est relocalisée à la membrane plasmique, la protéine CFTR-dF508 conserve une activité de canal chlorure (Cl^-) partielle, équivalente à environ 60 % de celle de la protéine CFTR sauvage. Toutefois, son temps de résidence membranaire est fortement réduit ($T_{1/2} \approx 3$ h) comparativement à celui de la forme sauvage ($T_{1/2} \approx 16$ h) (Sharma et al., 2004). Ainsi pour délocaliser la protéine CFTR mutée du RE en corrigeant son défaut de repliement, plusieurs molécules pharmacologiques ont été développées. Il y a d'abord les *correcteurs* (lumacaftor, tezacaftor, elexacaftor) qui favorisent le repliement et le trafic de CFTR, puis les *potentiateurs* (ivacaftor) qui augmentent l'activité fonctionnelle, ainsi que les molécules stabilisatrices du CFTR au niveau de la membrane (Baroni, 2025). La stratégie thérapeutique la plus efficace à ce jour repose sur la combinaison de correcteurs et de

potentiateurs, en particulier chez les patients homozygotes ou hétérozygotes pour la mutation F508del (Becq et al., 2022; Ghelani & Schneider-Futschik, 2020).

En l'absence d'un CFTR fonctionnel, la sécrétion des ions Cl^- est altérée, perturbant le transport de l'eau et entraînant l'accumulation de mucus épais dans les voies respiratoires (Hisert et al., 2017). Ce mucus visqueux favorise les obstructions bronchiques, les infections chroniques, l'inflammation persistante, et conduit à long terme à une bronchectasie et une insuffisance respiratoire. Fait notable, plusieurs études ont montré que des signes d'inflammation sont détectables dès les premiers stades de la maladie, avant même toute colonisation bactérienne.

Cela suggère que la dysfonction de CFTR pourrait, à elle seule, induire une réponse inflammatoire (Villate-Beitia et al., 2017), impliquant un rôle direct de CFTR dans la modulation de l'inflammation, au-delà de sa fonction de canal ionique (Kirby et al., 2013; Steines et al., 2016).

Cependant, les effets anti-inflammatoires des modulateurs de CFTR restent controversés. Si certains modèles cellulaires traités par expression de la protéine CFTR sauvage (wt-CFTR) ou par correction pharmacologique montrent une diminution de l'inflammation, d'autres ne révèlent aucun effet significatif. De plus, bien que les essais cliniques chez les patients porteurs de la mutation F508del aient montré une amélioration de la fonction pulmonaire, les effets sur l'inflammation demeurent incertains, avec une réduction de la réponse inflammatoire estimée à environ 60 %.

Ces données suggèrent que la diminution de l'inflammation dépend non seulement de la restauration de la fonction canal de CFTR, mais aussi de la présence d'une protéine correctement repliée à la membrane plasmique. En effet, une CFTR correctement repliée pourrait interagir avec d'autres protéines membranaires ou cytoplasmiques impliquées dans les voies de signalisation inflammatoire, jouant ainsi un rôle régulateur (Ramananda et al., 2024).

Des études en cryo-microscopie électronique (cryo-EM) ont montré que les correcteurs tels que lumacaftor et tezacaftor stabilisent CFTR en se logeant dans une cavité interne du domaine transmembranaire TMD1, reliant des hélices instables entre elles. Toutefois, ces correcteurs n'induisent pas de changements majeurs dans la conformation globale de CFTR-F508del (Fiedorczuk & Chen, 2022). Ces résultats confirment que, bien que les modulateurs puissent

restaurer partiellement la sécrétion des ions Cl^-, ils ne corrigent pas entièrement les défauts de structure tertiaire (TD) essentiels aux interactions de CFTR avec les protéines impliquées dans l'inflammation.

Pour mieux explorer cette relation, nous avons évalué les effets de modulateurs ciblant F508del (elexacaftor, lumacaftor, tezacaftor, genistein, miglustat) sur l'expression de CFTR, son trafic, son activité canal Cl^-, et la réponse inflammatoire dans les cellules épithéliales bronchiques humaines : saines (HBE), mucoviscidose (CF ; Cystic Fibrosis) (CFBE), CFBE surexprimant la protéine CFTR-dF508, et CFBE corrigées par la surexpression de la protéine wt-CFTR.

Les résultats montrent que seule la restauration complète de CFTR sauvage permet de normaliser la réponse inflammatoire.

En revanche, la correction pharmacologique partielle ne permet qu'une réduction partielle de cette inflammation. Une analyse de la structure tridimensionnelle, à travers des tests de résistance à la trypsine, révèle qu'en présence des correcteurs, utilisés seuls ou combinés, la protéine CFTR-F508del ne retrouve pas toute son intégrité structurelle comparé à la protéine sauvage, malgré la restauration de l'activité fonctionnelle.

Ces observations confirment que CFTR joue un double rôle dans la mucoviscidose : à la fois comme canal ionique et comme protéine transmembranaire structurellement intacte, essentielle à la régulation des réponses inflammatoires via probablement des interactions protéiques encore mal caractérisées.

Non-Infectious Inflammatory Response in CF Airway Epithelial Cells: A Comparative Study of Modulators and Wild-Type CFTR Rescue

Camille Lyko[1,2,3], Amal Kouadri[1,2,3], Johanna Cormenier[1,2,3], Kevin Gemy[1,2,3], Nadia Alfaidy[1,2,3], and Mohamed Benharouga[1,2,3].

[1] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1292, Laboratoire de BioSanté, Grenoble, France.

[2] Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), DSV-IRIG, Grenoble, France.

[3] Université Grenoble Alpes (UGA), Grenoble, France.

Running Title: Modulators vs. Wild-Type CFTR

Address correspondence:
Mohamed Benharouga, PhD, HDR
BioSanté/MAB2-INSERM U1292
IRiG, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, F-38054, Grenoble cedex 09, France
Phone : (+33) 4-38-78-01-17
E-mail : mohamed.benharouga@univ-grenoble-alpes.fr

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease caused by mutations in the CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) gene, resulting in defective CFTR protein folding, impaired chloride (Cl^-) transport, and chronic airway inflammation. While pharmacological modulators such as lumacaftor, tezacaftor, and elexacaftor restore CFTR activity at the plasma membrane and improve lung function in patients carrying the F508del mutation, their effects on inflammation remain inconsistent. This study aimed to investigate whether the inflammatory response in CF airway epithelial cells depends solely on Cl^- transport or also on the structural integrity of the CFTR protein. We examined the effects of several CFTR modulators and wild-type CFTR overexpression on CFTR expression, trafficking, Cl^- channel activity, and inflammation in human CF bronchial epithelial cells. Our results demonstrate that overexpression of wild-type CFTR fully restores Cl^- secretion and normalizes the inflammatory response to levels observed in non-CF cells. In contrast, pharmacological correction of F508del-CFTR leads to partial recovery of Cl^- transport and only limited reduction of inflammation. Structural analysis revealed that corrected F508del-CFTR fails to achieve the same conformational stability as wild-type CFTR. These findings suggest that beyond ion transport, the proper folding and structural integrity of CFTR are critical for regulating inflammation, potentially through interactions with other cellular proteins involved in inflammatory pathways. This work highlights the need to develop therapeutic strategies that not only restore chloride channel function but also fully correct CFTR misfolding to better control inflammation in CF.

Introduction:

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disorder with significant implications for patients health, primarily affecting the lungs and digestive system (1). The disease is caused by mutations in the CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) gene, which encodes the CFTR protein, an essential ion channel that regulates chloride (Cl^-) and bicarbonate transport across the apical membrane of epithelial cells (2).

More than 2,000 CFTR mutations have been identified (www.genet.sickkids.on.ca; www.CFTR2.org) and are classified based on their effects on CFTR biosynthesis, trafficking, stability, and function (3). The most common mutation, F508del, results in the deletion of a phenylalanine residue at position 508, leading to misfolding of the CFTR protein (4). This misfolded protein is recognized and degraded by the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) system (5). Although some misfolded CFTR proteins may escape ER quality control and reach the plasma membrane, they are still rapidly targeted for degradation (6).

To address CFTR folding defects caused by mutations such as F508del, several small-molecule correctors (e.g., lumacaftor, tezacaftor, elexacaftor) and potentiators (e.g., ivacaftor) have been developed and are now in clinical use (7). Depending on the mutation type, combination therapies using both correctors and potentiators are often necessary to achieve optimal therapeutic outcomes, particularly in individuals carrying the F508del mutation (8,9).

The absence of CFTR-mediated Cl^- secretion disrupts ion and water transport, resulting in the accumulation of thick mucus in the airways (10). Over time, this leads to airway obstruction, recurrent infections, chronic inflammation, bronchiectasis, and ultimately respiratory failure (10). Notably, inflammation is often detectable early in CF, even before bacterial colonization, suggesting that inflammatory processes may be triggered directly by CFTR dysfunction rather than by infection alone (11). This indicates that CFTR may play a direct role in modulating the inflammatory response and that restoring proper CFTR trafficking and function could help mitigate this inflammation (12,13).

However, studies using CF cell models in which Cl^- secretion was restored, either through wild-type (wt)-CFTR expression or pharmacological correction, have yielded conflicting results regarding the reduction of inflammation (14-20). While clinical trials with CFTR modulators have demonstrated significant improvements in lung function among F508del patients, their effects on inflammation remain unclear due to inconsistent findings. Recent clinical data report a reduction of only 60% in the inflammatory response in CF patients treated with CFTR modulators (21).

Taken together, these findings suggest that the inflammatory response in CF is not solely dependent on CFTR-mediated Cl^- transport but also on the presence of a fully folded and structurally intact CFTR protein at the plasma membrane. The properly folded CFTR is thought to interact with and regulate other membrane or cytoplasmic proteins involved in inflammatory signaling, thereby contributing to the modulation of inflammation (22).

Recent cryo-electron microscopy (cryo-EM) studies of lumacaftor-bound CFTR in both the NBD-separated and NBD-dimerized conformations, and of CFTR in complex with tezacaftor (VX661) in the NBD-dimerized state, indicate that these correctors stabilize CFTR by filling an internal cavity in TMD1 and linking together four thermodynamically unstable transmembrane helices (23). However, these structural adjustments occur without significant alteration of the overall conformation of F508del-CFTR (23). These findings confirm that modulators can restore Cl^- secretion by stabilizing CFTR, but they may not fully correct the tertiary defects (TD), required for CFTR's interaction with other proteins involved in inflammation.

To further investigate the relationship between CFTR and the inflammatory response in CF, we examined the effects of CFTR modulators targeting F508del, elexacaftor, lumacaftor, tezacaftor, genistein and miglustat, among others, on CFTR expression, cellular trafficking, Cl^- channel activity, and the inflammatory response in human bronchial epithelial cells. The study included healthy cells (HBE), CF bronchial epithelial cells (CFBE), and CFBE cells corrected by overexpressing wild-type CFTR (CFBE-wt).

Our results show that restoration of Cl^- secretion by wt-CFTR reduces the inflammatory response to levels observed in healthy cells. In contrast, pharmacological correction with CFTR modulators only partially reduced inflammation. Biochemical analysis of three-dimensional protein structure, assessed via trypsin resistance assays, revealed that F508del-CFTR corrected by modulators does not reach the same level of structural integrity as wt-CFTR, despite the partial restoration of Cl^- secretion.

These findings support the hypothesis that CFTR regulates the inflammatory response in CF, not only through its function as a Cl^- channel, but also through its presence as a fully folded transmembrane protein, which might be necessary for its regulatory interactions with other proteins involved in inflammation, which remain to be identified.

Materials and Methods

Cell Culture

The healthy human bronchial epithelial cell line (16HBE14o-; HBE), the cystic fibrosis cell line (CFBE41o-; CFBE) homozygous for the F508del mutation, CFBE cells overexpressing F508del-CFTR (CFBE-dF), and CFBE cells overexpressing wild-type CFTR (CFBE-wt), provided by D. Gruenert (University of California, San Francisco, CA, USA), were grown at 37 °C in 5% carbon dioxide (CO_2) and 95% air. The culture media were replaced every two days (24). These cell lines were grown in Eagle's minimum essential medium containing nonessential amino acids (Gibco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Eurobio, France) and 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich). CFBE-dF and CFBE-wt cell lines were maintained under selection using 5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ puromycin (Gibco). The baby hamster kidney (BHK) cell line overexpressing wt-CFTR was cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 5% FBS. in the presence of 250 µM methotrexate (25). All our cell lines were cultured in the absence of antibiotic and checked routinely for mycoplasma contamination.

Treatment by CFTR Modulators

F508del-CFTR proteins were restored to the plasma membrane by incubating cells with various correctors 24h prior to the experiments. Genistein (50 µM), Miglustat (200 µM), Elexacaftor (VX445, 3 µM), Tezacaftor (VX661, 18 µM), Lumacaftor (VX809, 3 µM) or a combination of VX661 and VX445 (3 µM and 18 µM). The selected concentrations were based on previous *in vitro* data describing the effect of these compounds on CF airway epithelial cells (8,25-28).

Isolation of Microsomes

Isolation of ER, Golgi, and plasma membrane-enriched microsomes from CFBE-wt and CFBE-dF, was performed using nitrogen cavitation and differential centrifugation as described (25). Where specified, the core-glycosylated wt or mutant CFTR was eliminated from the cells during a 3-h incubation in the presence of cycloheximide (CHX, 100 µg/ml). The microsomal pellet was resuspended in HSE medium (10 mM sodium HEPES, 0.25 M sucrose, pH 7.6) and used either immediately or after being snap-frozen in liquid nitrogen.

Limited Proteolysis and Glycosidase Digestion

Microsomes (50-70µg) isolated from CFBE-wt or CFBE-dF cells were exposed to trypsin at concentration of 0.05, 0.1, 0.5, or 1 mg/ml for 15 min at 4°C in digestion buffer (phosphate-buffered saline). Proteolysis was terminated by the addition of phenylmethylsulfonyl fluoride to 1 mM, and samples were immediately denatured in 2X Laemmli sample buffer at 37 °C for 20 min.

Electrophoresis and Immunoblotting

The cells were washed twice with ice-cold phosphate buffer saline (PBS, Sigma Aldrich) and lysed at 4°C for 20 min in PBS containing 1% Tween added with protease inhibitors (10mM PMSF, 1µM leupetin/pepstatin A and 1mg/ml of iodoacetamide).

Protein concentrations were measured using the Micro BCA protein assay kit (Thermo scientific). All protein samples were in 1X final concentration of Laemmli Sample Buffer (LSB 5X: 60mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerol, 5% β-Mercaptoethanol, 0.01% Bromophenol Blue), subjected to a SDS-PAGE (6% migration gel), transferred onto nitrocellulose membranes (Bio- Rad) and probed with corresponding primary antibodies. The membranes were then probed with a secondary antibody coupled to HRP (Covalab) and the reaction was revealed using ECL (Bio-Rad) in iBright imaging system (Thermo scientific).

CFTR immunoblotting was performed with anti-CFTR monoclonal antibodies (mAb, Abcam). Wt CFTR and F508del were visualized with the mouse monoclonal M3A7 and L12B4 anti-CFTR Abs. L12B4 recognizes the region of the cytoplasmic NBD1 of CFTR (epitope within the range of amino acid positions 386 and 412), and M3A7 recognizes to the region of the cytoplasmic NBD2 of CFTR (epitope within the range of amino acid positions 1365 and 1395) (25). Immunoblots, with multiple exposures, were quantified using N.I.H. Image J software.

Determination of cAMP-stimulated Iodide Conductance

The plasma membrane cAMP-dependent halide conductance of transfected BHK, CFBE, CFBE-wt or CFBE-dF cells was determined with iodide efflux as described (25). In brief, the chloride content was replaced with iodide by incubating the cells in loading buffer (136 mM NaI, 3 mM KNO_3, 2 mM Ca $(NO_3)_2$, 11 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4) for 60 min at room temperature. Iodide efflux was initiated by replacing the loading buffer with efflux medium (composed of 136 mM nitrate in place of iodide). The extracellular medium was replaced every minute with efflux buffer (1 ml). After a steady-state was reached, the intracellular cAMP level was raised by agonists (10 mM forskolin, 0.2 mM CTP-cAMP, and 0.2 mM isobutylmethylxanthine) to achieve maximal phosphorylation of wt- or F508del-CFTR, and collection of the efflux medium resumed for an additional 6 to 9 min. The amount of iodide in each sample was determined with an iodide selective electrode (Orion).

Cytokine Secretion by Sandwich ELISA

Before cell lysis, all supernatants were kept for ELISA test. Interleukins (IL) IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17 (A, E, F) and tumor necrosis factor-alpha (TNFα) released into the culture media and present in proteins extract were assayed using a quantitative sandwich enzyme-linked immunoassay kit (PeproTech). According to the manufacturer, the sensitivity of this assay system is less than 10 pg/mL. For ELISA assays, very low auto-fluorescence was detected in the absence of any treatment. The value of this auto-fluorescence was systematically subtracted from the experimental values.

Statistical Analysis

Differences between mean values were compared by Student's unpaired two-tailed t-tests using SigmaStat (Jandel Scientific Software, SanRafael, CA, USA). Data are expressed as mean ± SEM, unless otherwise indicated. Significance was set at a two-tailed p value of 0.05.

Results

Cellular models for the investigation of inflammation response

Three cellular models were used to investigate the endogenous inflammatory response in relation to CFTR protein expression and function.

Human bronchial epithelial (HBE) cells, a widely used healthy cell line and a reference model for CF (29), were used as controls (Fig. 1A, HBE). A key advantage of this model is the existence of a counterpart cell line carrying the homozygous F508del mutation (CFBE) (24). This latter model endogenously expresses low levels of the mutant F508del-CFTR protein (Fig. 1A). To enhance the expression of F508del-CFTR while maintaining a native bronchial cell context, the CFBE-F508del (dF) model was generated (24) and is now widely employed to study the effects of CFTR corrector and potentiator compounds (30) (Fig. 1A, dF).

Additionally, CFBE cells were engineered to overexpress the wild-type CFTR protein (wt). This model enables direct comparison between the effects of pharmacological treatments and the expression of functional wt-CFTR (Fig. 1A, wt). BHK cells were used solely as a control to compare basal CFTR expression levels in healthy and CFBE cells (Fig. 1A). To evaluate CFTR function, iodide efflux was measured in the absence or presence of cAMP, which is known to activate CFTR channel gating in association with ATP (27). Two minutes after cAMP stimulation, CFTR activity was detected in CFBE-wt cells (~21.5 ± 0.7 nmol/mL/min), which was significantly higher than the activity measured in untransfected CFBE cells (Fig. 1B).

To correlate CFTR chloride channel activity with its expression level, the iodide efflux measured at 2 minutes post-cAMP stimulation was expressed as a percentage of the activity measured in BHK-CFTR cells, which was arbitrarily set at 100% (Fig. 1C). The results showed that HBE cells exhibited approximately 20% ± 3% of CFTR activity, while CFBE-F508del cells displayed only residual Cl^- channel activity (Fig. 1C). In contrast, CFBE-wt cells reached ~145% ± 5% activity, supporting a correlation between CFTR expression and functional output (Fig. 1C).

Altogether, these data validate the use of these cellular models to study the relationship between CFTR expression, function, and the associated inflammatory response.

Expression and Function of CFTR in the Presence of Correctors

Our study aims to compare the endogenous inflammatory response following the restoration of chloride channel activity, either through treatment with corrector molecules or via overexpression of the CFTR protein. We used correctors that have been shown to effectively restore chloride ion secretion, some of which are currently used in clinical settings (VX809, VX661, and VX445) (31).

The effect of correctors on CFTR-F508del trafficking was first evaluated by immunoblotting, detecting the appearance of bands C, B, and A corresponding to the hyperglycosylated (or mature form, ~170 kDa), core-glycosylated (or immature form, ~140 kDa), and non-glycosylated forms (~135 kDa), indicated by black, white, and grey arrows, respectively (Fig. 2A). Compared to the control, all tested molecules, used individually or in combination (VX661 plus VX445), induced the appearance of band C, which intensity was higher with miglustat and VX445 (Fig. 2A). The combination of VX661 and VX445 dramatically increased the expression level of band C (Fig. 2A, black arrow). These molecules also enhanced the expression of band B, except for VX808 (Fig. 2A, white arrow). The expression level of band C was correlated with chloride channel activity after cAMP stimulation. Our results clearly demonstrate that the VX661/VX445 combination led to a significantly higher level of activation (~9,2 ± 0.9 nmol/mL/min) compared to individual treatments, which resulted in activation levels ranging from 3 to 5.7 nmol/mL/min.

These findings confirm the corrector effect and demonstrate a correlation between chloride channel activity and CFTR expression level following treatment.

The inflammatory profile of CFBE-dF cells

CFBE cells are a widely used immortalized human bronchial epithelial cell line derived from a CF patient homozygous for the F508del mutation (24). These cells are extensively used to investigate CFTR expression, trafficking, and function, as well as CF-related inflammatory responses (32). Moreover, CFBE cells serve as a well-established model for evaluating CFTR modulators, such as correctors and potentiators, and their effects on CFTR protein maturation, subcellular localization, and Cl^- ion transport (33).

We have previously demonstrated that intrinsic reactive oxygen species (ROS) production in CFBE cells activate various signaling pathways that promote the production and secretion of pro-inflammatory cytokines, even in the absence of bacterial or viral infection (34).

In this study, we used CFBE cells overexpressing the F508del-CFTR (CFBE-dF) to evaluate the effects of several correctors on CFTR expression and function. We then analyzed their steady-state inflammatory profiles in comparison to healthy bronchial epithelial (HBE) cells (Fig. 3).

Using ELISA assays, we measured both the intracellular (i) production (supplementary data) and extracellular secretion of several pro-inflammatory cytokines: IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17A, IL-17F, IL-17E, and TNFα. Our results show that overexpression of F508del-CFTR in CFBE cells does not significantly affect either the production or secretion of the tested cytokines (Fig. 3 and Fig. S1). However, compared to HBE controls, CFBE-dF cells exhibited a significant increase in both production and secretion of IL-1β, IL-6, IL-17A, IL-17F, and IL-17E (Fig. 3A, B, D, E, F, G). Interestingly, although CFBE-dF cells produced high levels of IL-8, their secretion of this cytokine was significantly reduced (Fig. 3C, and Fig. S1). For TNFα, the decrease was observed at both the production and secretion levels (Fig. 3D, S1D).

These findings are consistent with our observations in non-transfected CFBE cells and suggest that overexpression of F508del-CFTR, despite its potential to stress the endoplasmic reticulum, does not exacerbate the inflammatory profile of CFBE cells. Moreover, they point to a defect in the secretion or exocytosis machinery associated with the F508del mutation with respect to IL-8.

CFTR-wt expression improves the inflammatory state in CFBE cells

The involvement of the CFTR protein in the bronchial inflammatory response in the absence of any infection has been proposed by several studies (11). Moreover, inhibition of CFTR activity supports these findings and suggests that the presence of functional CFTR at the membrane contributes to the regulation of the inflammatory response in human bronchial epithelial cells. We took advantage of the availability of CFBE cells in which Cl^- ion secretion has been restored through the expression of wt-CFTR (2). This cellular model was used to study

the production and secretion of the different tested cytokines. To assess the corrective effect of wt-CFTR expression on the inflammatory response, we compared our results to those obtained with uncorrected CFBE cells (Fig. 4).

Our analysis of secreted cytokine levels, showed no significant correction between CFBE and CFBE-wt cells regarding IL-1β and IL-17A (Fig. 4A and 4E). IL-8 secretion remained impaired (Fig. 4C) despite increased intracellular production in CFBE-wt cells (Fig. S2C). A significant reduction in IL-6 levels production (S2B) and secretion (Fig. 4B), however, was observed in CFBE-wt cells.

Additionally, TNFα secretion was further reduced in CFBE-wt cells compared to CFBE cells (Fig. 4D), even though its production was increased (Fig. S2D). No changes were detected for IL-17A (Fig. 4E), while both IL-17F and IL-17E showed a decrease in their secretion (Fig. 4F and 4G). Taken together, these results indicate that the restoration of CFTR expression and function reduced the inflammatory profile in CFBE cells.

Correctors and inflammatory responses

CFTR modulators enhanced chloride ion transport, partially restored mucus hydration, and reduced epithelial stress, two factors known to indirectly attenuate inflammation (35). In the absence of bacterial infection, the restoration of chloride ion secretion through the expression of a normal CFTR gene significantly improved the inflammatory profile of CFBE-dF cells (Fig. 4). However, the effects of CFTR modulators on the production and secretion of inflammatory mediators in a non-infectious context remain poorly defined. Figures 5 present a comparative analysis of all tested molecules on the expression and secretion of IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, IL-17A, IL-17F, and IL-17E.

Surprisingly, most of the tested molecules led to an increase in cytokine secretion, with the exception of IL-6 and IL-17A, for which levels were decreased (Fig. 5A-D and Fig. 6A-C). Specifically for IL-6, all correctors except genistein significantly reduced its secretion (Fig. 5B). A similar trend was observed for IL-17A (Fig. 6E). These results contrast with those obtained in protein extracts (Fig. S3), where we observed a decrease in IL-8 production, except with miglustat (Fig. S3C). For IL-6, the production results were consistent with the secretion data (Fig. S3B). Taken together, our findings indicate that in the absence of bacterial infection, corrector molecules can reduce the inflammatory profile of CFBE-F508del cells by selectively downregulating the production and secretion of IL-6 and IL-17A.

Correctors rescue but do not fully repair CFTR-delF508 folding defects

The intracellular trafficking defects and impaired chloride channel activity associated with the CFTR-F508del protein were corrected in CFBE-dF cells using two strategies: expression of

the wt-CFTR protein or pharmacological treatment with correctors (Fig. 1 and 2). However, the effects of these two approaches on the inflammatory profile of CFBE-dF cells, in the absence of bacterial infection, were not identical. Several mechanisms could underlie this difference, including variations in the degree of CFTR protein folding.

To test this hypothesis, we performed limited proteolysis combined with immunoblot analysis to assess whether the conformation of CFTR-F508del rescued by correctors differed structurally from that of wt CFTR. Microsomes were isolated by differential centrifugation following 3h treatment with 100µg/ml of cycloheximide, which decreased the core-glycosylated form by 80–86% according to densitometric analysis (data not shown). The cleavage patterns of wt, F508del, and rescued CFTR proteins, generated by limited trypsin digestion, were analyzed by immunoblotting.

Since the half-life of core-glycosylated (immature) CFTR is approximately 2 hours, cells were treated with cycloheximide (CHX) for 2.5 hours to ensure the degradation of immature CFTR prior to microsome isolation.

This allowed for enrichment of the mature forms of wt and rescued F508el-CFTR (Fig. 6A and B). Protease resistance of wt- and rescued F508del-CFTR to *in-situ* trypsin digestion was consistently higher following treatment with VX809 or the VX661 + VX445 combination, regardless of whether the NBD2- or NBD1-specific monoclonal antibodies (M3A7 and L12B4, respectively) were used (Fig. 7A and B). These results confirm the role of correctors in stabilizing CFTR's dynamic intramolecular interactions (36).

However, despite the corrective effects of the VX661 + VX445 combination, distinct differences in proteolysis-resistant band patterns remained (Fig. 7B), indicating a persistent intrinsic folding defect. This defect, while not impairing membrane localization or basic CFTR function, may nonetheless hinder proper interaction with other proteins and thus prevent effective regulation of the inflammatory response, unlike the fully functional wt-CFTR.

Discussion

Our study aimed to investigate the role of restoring Cl^- ion secretion in mitigating the inflammatory response in bronchial epithelial cells affected by cystic fibrosis (CF), with a particular focus on how the folding state of CFTR at the plasma membrane may influence this process. We used CFBE cells overexpressing F508del-CFTR (CFBE-dF) and observed that their inflammatory profiles closely match those of parental CFBE cells, validating our earlier findings (34). These cellular models are well established in CF research for studying both inflammation and CFTR modulator effects (34,37). To restore CFTR expression and function at the plasma membrane, we used either the overexpression of wt-CFTR (CFBE-wt) or

modulators of dF508-CFTR stably expressed in CFBE cells (CFBE-dF). As previously described (34), We evaluate the production (supplementary data) and the secretion of several pro-inflammatory cytokines such as IL1β, IL6, IL8, TNFα, and IL17 (A, F, E).

The introduction of CFTR modulators such as ivacaftor (VX-770), lumacaftor (VX-809), tezacaftor (VX-661), elexacaftor (VX-445) and VX (661+445) has provided a therapeutic avenue by directly addressing the underlying defect in CFTR protein folding. These modulators act either as correctors improving CFTR trafficking to the plasma membrane or as potentiators, enhancing channel function (38). VX-809 and VX-661, categorized as type 1 correctors, have been shown to stabilize interdomain interactions, particularly between NBD1 and TMD1, supporting improved CFTR folding (38). However, despite the appearance of band C (mature form) and the restoration of Cl^- secretion, the CFTR modulators effects were selective and have reduced only the secretion of IL-6, and IL-17A. For the others cytokines, the effect was even the opposite with an increase in their secretion level, suggesting that the restauration of CFTR expression and function is not enough to reduce the inflammatory response. Similar results were observed with miglustat. However, the expression of wt-CFTR protein induced a significant decrease in the secretion of IL-6, IL-8, TNα, IL-17F and IL-17E, suggesting a broader effect on cytokine production and secretion compared to CFTR modulators. These results also demonstrate that restoration of expression and function by CFTR modulators is probably not sufficient to reduce inflammation. These results are supported by several observations; Ivacaftor, for instance, was associated with reduced neutrophil activity and enhanced apoptosis, potentially dampening the pro-inflammatory environment (29). Yet, transcriptomic studies indicate that inflammatory gene expression remains elevated in F508del homozygous patients even after ivacaftor-lumacaftor therapy (39).

Our study also confirms that FDA-approved correctors like VX-661 and VX-445 enhance CFTR maturation (evidenced by increased band C) and functional output (iodide efflux), even under inflammatory conditions. This observation contrasts with previous reports suggesting that inflammation may impair CFTR correction (40). The difference may lie in the specific inflammatory mediators involved, which can variably influence CFTR expression and function (36,41).

Clinical trials with ivacaftor-lumacaftor and triple combination therapies like ivacaftor-tezacaftor-elexacaftor have shown differential efficacy in restoring lung function and reducing exacerbations (42,43).

The inflammatory outcomes have been inconsistent. Some studies reported improved inflammatory markers (44), while others showed persistent activation of pathways like IL-17 signaling, oxidative phosphorylation, and eIF2 (45).

Furthermore, VX-445 combined with VX-661 and VX-770 restored ~60–70% of CFTR function in F508del cells but did not fully stabilize the protein (46). Ubiquitination studies indicated residual instability, suggesting incomplete rescue. These effects may vary depending on the cellular context, where VX-445 might function as a co-potentiator or enhance mature CFTR expression depending on the degree of misfolding (47).

In addition to targeting CFTR defects, modulator therapies may influence the inflammatory lung environment, acting as broader disease modulators (35,48).

Recent work suggests inflammation may even enhance *in vitro* CFTR rescue, supporting the idea of feedback loops between inflammation and CFTR function (36).

Based on our results, we speculate that the only difference between the two experimental conditions used in our study lies in the structural difference at the membrane level. Indeed, *in-situ* protease susceptibility results confirm the existence of a structural differences even if the band C is detected, more stable and functional. The *in-situ* protease susceptibility assays suggest that even after correction with VX661/VX445, F508del-CFTR did not achieve the thermodynamic stability of wild-type CFTR. Structural instability may impede necessary protein-protein interactions for modulating inflammatory pathways. Recent cryo-EM studies confirmed that VX809/VX661 stabilize key intra-domain interactions, but those experiments were conducted on wild-type CFTR, limiting their applicability to F508del variants (23).

Our findings suggest that while modulator therapy improves CFTR function, it does not fully correct the inflammatory deregulations, likely due to residual structural defects in F508del-CFTR. This supports the hypothesis that a fully folded CFTR conformation is necessary for modulating inflammatory signaling. Additional therapeutic strategies may be required to address these residual defects and their associated-inflammatory consequences.

In conclusion, restoring Cl^- transport via CFTR modulators partially attenuates inflammation in CF epithelial models. However, persistent protein instability and complex cellular responses to inflammation underline the need for combinatorial approaches targeting both CFTR folding and inflammatory signaling pathways to achieve complete therapeutic benefit.

Acknowledgments

For financial support, we acknowledge the following sources of fundings: Vaincre la mucoviscidose (VLM), ABCF Foundation, University Grenoble-Alpes, Institut National de la

Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). Ms Camille Lyko is supported by IRGA program, Ms Johanna Cormenier was supported by VLM, and Mr Kevin Gemy was supported by la Ligue Contre le Cancer. Also, We would like to thank the LCBM and BioSanté members for their assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. N Engl J Med. 12 mai 2005;352(19):1992-2001.
2. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science. 8 sept 1989;245(4922):1073-80.
3. Ranganathan SC, Hall GL, Sly PD, Stick SM, Douglas TA. Early Lung Disease in Infants and Preschool Children with Cystic Fibrosis. What Have We Learned and What Should We Do about It? Am J Respir Crit Care Med. 15 juin 2017;195(12):1567-75.
4. Zeng M, Szymczak M, Ahuja M, Zheng C, Yin H, Swaim W, et al. Correction of Ductal CFTR Activity Rescues Acinar Cell and Pancreatic and Salivary Gland Functions in Mouse Models of Autoimmune Disease. Gastroenterology. 1 oct 2017;153(4):1148-59.
5. Benharouga M, Haardt M, Kartner N, Lukacs GL. COOH-terminal truncations promote proteasome-dependent degradation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from post-Golgi compartments. J Cell Biol. 28 mai 2001;153(5):957-70.
6. Sharma M, Pampinella F, Nemes C, Benharouga M, So J, Du K, et al. Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. J Cell Biol. 15 mars 2004;164(6):923-33.
7. Baroni D. Unraveling the Mechanism of Action, Binding Sites, and Therapeutic Advances of CFTR Modulators: A Narrative Review. Curr Issues Mol Biol. 11 févr 2025;47(2):119.
8. Becq F, Mirval S, Carrez T, Lévêque M, Billet A, Coraux C, et al. The rescue of F508del-CFTR by elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (Trikafta) in human airway

epithelial cells is underestimated due to the presence of ivacaftor. Eur Respir J. févr 2022;59(2):2100671.

9. Ghelani DP, Schneider-Futschik EK. Emerging Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Modulators as New Drugs for Cystic Fibrosis: A Portrait of in Vitro Pharmacology and Clinical Translation. ACS Pharmacol Transl Sci. 14 févr 2020;3(1):4-10.

10. Hisert KB, Heltshe SL, Pope C, Jorth P, Wu X, Edwards RM, et al. Restoring Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function Reduces Airway Bacteria and Inflammation in People with Cystic Fibrosis and Chronic Lung Infections. Am J Respir Crit Care Med. 15 juin 2017;195(12):1617-28.

11. Villate-Beitia I, Zarate ,Jon, Puras ,Gustavo, and Pedraz JL. Gene delivery to the lungs: pulmonary gene therapy for cystic fibrosis. Drug Dev Ind Pharm. 3 juill 2017;43(7):1071-81.

12. Steines B, Dickey DD, Bergen J, Excoffon KJDA, Weinstein JR, Li X, et al. *CFTR* gene transfer with AAV improves early cystic fibrosis pig phenotypes. JCI Insight [Internet]. 8 sept 2016 [cité 26 juin 2025];1(14). Disponible sur: https://insight.jci.org/articles/view/88728

13. Kirby EF, Heard AS, Wang XR. Enhancing the Potency of F508del Correction: A Multi-Layer Combinational Approach to Drug Discovery for Cystic Fibrosis. J Pharmacol Clin Toxicol. 28 août 2013;1(1):1-7.

14. Bangel-Ruland N, Tomczak K, Weber WM. Targeting ENaC as a Molecular Suspect in Cystic Fibrosis. Curr Drug Targets. 16(9):951-7.

15. Mall MA, Galietta LJV. Targeting ion channels in cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 1 sept 2015;14(5):561-70.

16. Pesci E, Bettinetti L, Fanti P, Galietta LJV, La Rosa S, Magnoni L, et al. Novel Hits in the Correction of ΔF508-Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance

Regulator (CFTR) Protein: Synthesis, Pharmacological, and ADME Evaluation of Tetrahydropyrido[4,3-d]pyrimidines for the Potential Treatment of Cystic Fibrosis. J Med Chem. 24 déc 2015;58(24):9697-711.

17. Brewington JJ, McPhail ,Gary L., and Clancy JP. Lumacaftor alone and combined with ivacaftor: preclinical and clinical trial experience of F508del CFTR correction. Expert Rev Respir Med. 2 janv 2016;10(1):5-17.

18. Lubamba B, Lebacq J, Lebecque P, Vanbever R, Leonard A, Wallemacq P, et al. Airway Delivery of Low-Dose Miglustat Normalizes Nasal Potential Difference in F508del Cystic Fibrosis Mice. Am J Respir Crit Care Med. juin 2009;179(11):1022-8.

19. Norez C, Antigny F, Noel S, Vandebrouck C, Becq F. A Cystic Fibrosis Respiratory Epithelial Cell Chronically Treated by Miglustat Acquires a Non–Cystic Fibrosis–Like Phenotype. Am J Respir Cell Mol Biol. août 2009;41(2):217-25.

20. Norez C, Noel S, Wilke M, Bijvelds M, Jorna H, Melin P, et al. Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the α-glucosidase inhibitor miglustat. FEBS Lett. 2006;580(8):2081-6.

21. De Boeck K, Lee T, Amaral M, Drevinek P, Elborn JS, Fajac I, et al. Cystic fibrosis drug trial design in the era of CFTR modulators associated with substantial clinical benefit: stakeholders' consensus view. J Cyst Fibros. 1 sept 2020;19(5):688-95.

22. Ramananda Y, Naren AP, Arora K. Functional Consequences of CFTR Interactions in Cystic Fibrosis. Int J Mol Sci. janv 2024;25(6):3384.

23. Fiedorczuk K, Chen J. Mechanism of CFTR correction by type I folding correctors. Cell. 6 janv 2022;185(1):158-168.e11.

24. Gruenert DC, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. Culture and transformation of

human airway epithelial cells. Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol. mars 1995;268(3):L347-60.

25. Sharma M, Benharouga M, Hu W, Lukacs GL. Conformational and temperature-sensitive stability defects of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in post-endoplasmic reticulum compartments. J Biol Chem. 23 mars 2001;276(12):8942-50.

26. Keating D, Marigowda G, Burr L, Daines C, Mall MA, McKone EF, et al. VX-445-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. N Engl J Med. 25 oct 2018;379(17):1612-20.

27. Suaud L, Li J, Jiang Q, Rubenstein RC, Kleyman TR. Genistein restores functional interactions between Delta F508-CFTR and ENaC in Xenopus oocytes. J Biol Chem. 15 mars 2002;277(11):8928-33.

28. Dechecchi MC, Nicolis E, Norez C, Bezzerri V, Borgatti M, Mancini I, et al. Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epithelial cells. J Cyst Fibros. 1 nov 2008;7(6):555-65.

29. Hardisty GR, Law SM, Carter S, Grogan B, Singh PK, McKone EF, et al. Ivacaftor modifies cystic fibrosis neutrophil phenotype in subjects with R117H residual function CFTR mutations. Eur Respir J [Internet]. 21 janv 2021 [cité 26 juin 2025];57(1). Disponible sur: https://publications.ersnet.org/content/erj/57/1/2002161

30. Haggie PM, Phuan PW, Tan JA, Xu H, Avramescu RG, Perdomo D, et al. Correctors and Potentiators Rescue Function of the Truncated W1282X-Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) Translation Product. J Biol Chem. 20 janv 2017;292(3):771-85.

31. Pastor-Vivero MD, Costa i Colomer J, Martín de Vicente C, Vicente-Santamaria S, Garcia Romero R, González Jiménez D, et al. Advances in the treatment of

cystic fibrosis: CFTR modulators. An Pediatría Engl Ed. 1 mai 2025;102(5):503857.

32. Hallows KR, Fitch AC, Richardson CA, Reynolds PR, Clancy JP, Dagher PC, et al. Up-regulation of AMP-activated kinase by dysfunctional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in cystic fibrosis airway epithelial cells mitigates excessive inflammation. J Biol Chem. 17 févr 2006;281(7):4231-41.

33. Becq F, Mirval S, Carrez T, Lévêque M, Billet A, Coraux C, et al. The rescue of F508del-CFTR by elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (Trikafta) in human airway epithelial cells is underestimated due to the presence of ivacaftor. Eur Respir J [Internet]. 24 févr 2022 [cité 26 juin 2025];59(2). Disponible sur: https://publications.ersnet.org/content/erj/59/2/2100671

34. Kouadri A, Cormenier J, Gemy K, Macari L, Charbonnier P, Richaud P, et al. Copper-Associated Oxidative Stress Contributes to Cellular Inflammatory Responses in Cystic Fibrosis. Biomedicines. avr 2021;9(4):329.

35. Harvey C, Weldon S, Elborn S, Downey DG, Taggart C. The Effect of CFTR Modulators on Airway Infection in Cystic Fibrosis. Int J Mol Sci. janv 2022;23(7):3513.

36. Ribeiro CMP, Gentzsch M. Impact of Airway Inflammation on the Efficacy of CFTR Modulators. Cells. 22 nov 2021;10(11):3260.

37. Laselva O, Allegretta C, Di Gioia S, Avolio C, Conese M. Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Effect of Dimethyl Fumarate in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells. Cells. août 2021;10(8):2132.

38. Okiyoneda T, Veit G, Dekkers JF, Bagdany M, Soya N, Xu H, et al. Mechanism-based corrector combination restores ΔF508-CFTR folding and function. Nat Chem Biol. juill 2013;9(7):444-54.

39. Kopp BT, Fitch J, Jaramillo L, Shrestha CL, Robledo-Avila F, Zhang S, et al.

Whole-blood transcriptomic responses to lumacaftor/ivacaftor therapy in cystic fibrosis. J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc. mars 2020;19(2):245-54.

40. Cruz DF, Mitash N, Farinha CM, Swiatecka-Urban A. TGF-β1 Augments the Apical Membrane Abundance of Lemur Tyrosine Kinase 2 to Inhibit CFTR-Mediated Chloride Transport in Human Bronchial Epithelia. Front Cell Dev Biol. 2020;8:58.

41. Prulière-Escabasse V, Fanen P, Dazy AC, Lechapt-Zalcman E, Rideau D, Edelman A, et al. TGF-β1 downregulates CFTR expression and function in nasal polyps of non-CF patients. Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol. janv 2005;288(1):L77-83.

42. Taylor-Cousar JL, Munck A, McKone EF, van der Ent CK, Moeller A, Simard C, et al. Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. N Engl J Med. 23 nov 2017;377(21):2013-23.

43. Kleizen B, Hunt JF, Callebaut I, Hwang TC, Sermet-Gaudelus I, Hafkemeyer S, et al. CFTR: New insights into structure and function and implications for modulation by small molecules. J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc. mars 2020;19 Suppl 1:S19-24.

44. Cholon DM, Quinney NL, Fulcher ML, Esther CR, Das J, Dokholyan NV, et al. Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of ΔF508 CFTR in cystic fibrosis. Sci Transl Med. 23 juill 2014;6(246):246ra96.

45. Hsu D, Taylor P, Fletcher D, van Heeckeren R, Eastman J, van Heeckeren A, et al. Interleukin-17 Pathophysiology and Therapeutic Intervention in Cystic Fibrosis Lung Infection and Inflammation. Infect Immun. 19 août 2016;84(9):2410-21.

46. Capurro V, Tomati V, Sondo E, Renda M, Borrelli A, Pastorino C, et al. Partial Rescue of F508del-CFTR Stability and Trafficking Defects by Double Corrector

Treatment. Int J Mol Sci. 17 mai 2021;22(10):5262.

47. Tomati V, Costa S, Capurro V, Pesce E, Pastorino C, Lena M, et al. Rescue by elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor of the G1244E cystic fibrosis mutation's stability and gating defects are dependent on cell background. J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc. mai 2023;22(3):525-37.

48. Lussac-Sorton F, Charpentier É, Imbert S, Lefranc M, Bui S, Fayon M, et al. The gut-lung axis in the CFTR modulator era. Front Cell Infect Microbiol. 2023;13:1271117.

Figure legends

Figure 1: CFTR expression and function in Human Bronchial Epithelial cell models

(**A**) Protein extract from BHK-21 cells stably expressing wild type CFTR, healthy **(**HBE), cystic fibrosis (CFBE), Human Bronchial Epithelial cells, and CFBE stably expressing wild-type (CFBE-wt) or F508del-CFTR (dF) were used in immunoblot assays to determine the expression level of CFTR protein using anti-CFTR antibody (L12B4). Black and white arrows indicate fully glycosylated mature CFTR (band C) and core-glycosylated CFTR (band B), respectively.

(**B**) The iodide efflux was used as a functional assay to determine the cAMP-dependent activity of CFTR chloride channel for the indicated time. Arrow (+ cAMP) indicate the time (0) where a cAMP cocktail was used to stimulate the CFTR activity.

(**C**) The iodide efflux activation peak of HBE, CFBE-dF and CFBE-wt were evaluated at 2 min following the stimulation with cAMP and reported as a percentage (%) of the activation of wt-CFTR stably expressed in BHK-21 cells. Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls ($P < 0.05$). Data are expressed as mean ± SE (n = 7).

Figure 2: Modulation of CFTR-delF508 expression and Cl^- channel activity by correctors

(**A**) Following 24h treatment with tested correctors; genistein (50 μM), miglustat (200 μM), VX809 (3 μM), VX661 (18 μM), VX445 (3 μM) or VX445/VX661 (3 μM and 18 μM), protein extracts prepared form CFBE cells stably expressing CFTR-delF508 (CFBE-F508del) were subjected to immunoblot assay. Mature- (form C), immature (form B) and non- (form A) glycosylated CFTR-delF508 indicated with black, white and grey arrow, respectively, were identified using anti-CFTR antibody (L12B4).

(**B**) The iodide efflux was used as a functional assay to determine the cAMP-dependent activity of CFTR chloride channel for the indicated time. The activation peak of CFBE-dF were evaluated at 2 min following the stimulation with cAMP.

Figure 3: Comparative analysis of the inflammatory secretome in HBE and CFBE-dF Cells

The inflammatory profile was evaluated using a quantitative sandwich enzyme-linked immunoassay (ELISA). Measurements of IL-1β (**A**), IL-6 (**B**), IL-8 (**C**), TNFα (**D**), IL-17A (**C**), IL-17F (**F**), and IL-17E (**G**) were assessed in conditioned media of HBE or CFBE-F508del (CFBE-dF) cells.

The results are reported in pg/mg of extracted proteins. Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls ($P < 0.05$). Data are expressed as mean ± SE ($n = 7$).

Figure 4: Comparative analysis of the inflammatory secretome in CFBE-dF and CFBE-wt Cells

The ELISA assay was used under the same conditions as described in Figure 3. Released culture media of CFBE-wt and CFBE-dF cells were collected and the concentration of IL-1β (**A**), IL-6 (**B**), IL-8 (**C**), TNFα (**D**), IL-17A (**C**), IL-17F (**F**), and IL-17E (**G**) were evaluated and expressed as pg/mg of protein extract. Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls ($P < 0.05$). Data are expressed as mean ± SE ($n = 7$).

Figure 5: Impact of CFTR Correctors on the Inflammatory Response of CFBE-dF Cells

Following 24h treatment of CFBE cells stably expressing CFTR-F508del (CFBE-dF) with the indicated correctors; genistein (50 μM), miglustat (200 μM), VX809 (3 μM), VX661 (18 μM), VX445 (3 μM) or VX445/VX661 (3 μM and 18 μM), release culture media were collected and the concertation of IL-1β (A), IL-6 (**B**), IL-8 (**C**), TNFα (**D**), IL-17A (**E**), IL-17F (**F**), and IL-17E (**G**) were evaluated using ELISA assays. The results are reported in pg/mg of protein extract. Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls ($P < 0.05$). Data are expressed as mean ± SE ($n = 7$).

Figure 6: *In situ* protease susceptibility of wt-, dF508del-, and rescued F508del-CFTR.

Complex glycosylated dF508-CFTR was accumulated during a 24-h rescue procedure as described in material and methods section. To substantially reduce the core-glycosylated form in wt- and rescued dF508del-CFTR expressors, cells were treated with CHX (100 μg/ml) for 3 h, and the lysates were probed with anti-CFTR mAb. Microsomes were isolated with differential centrifugation, and limited proteolysis was performed using trypsin at the following concentrations: 0, 0.05, 0.1, 0.5, and 1 mg/ml for 15 min at 4 °C. Samples (50–75 μg of protein/lane) were immunoblotted with the M3A7 (**A**, NBD2) or L12B4 (**B**, NBD1) anti-CFTR mAbs and visualized with ECL.

Figure 1

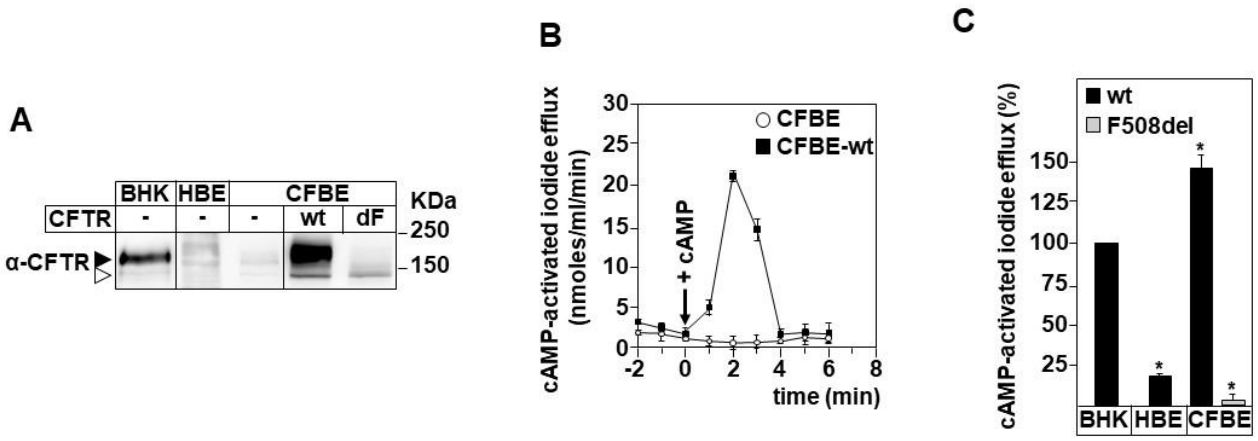


Figure 2

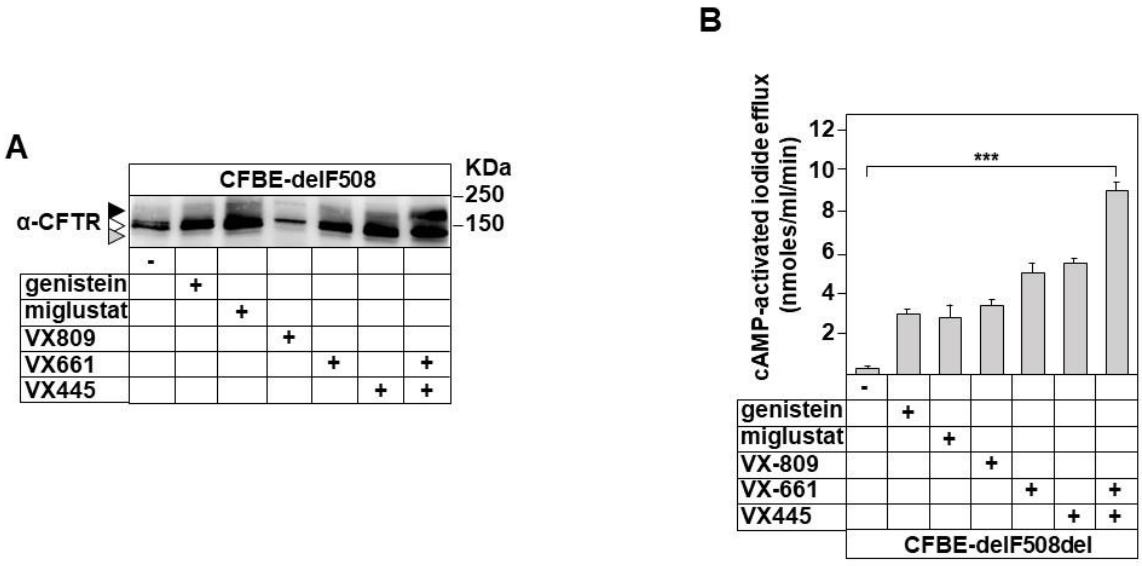


Figure 3

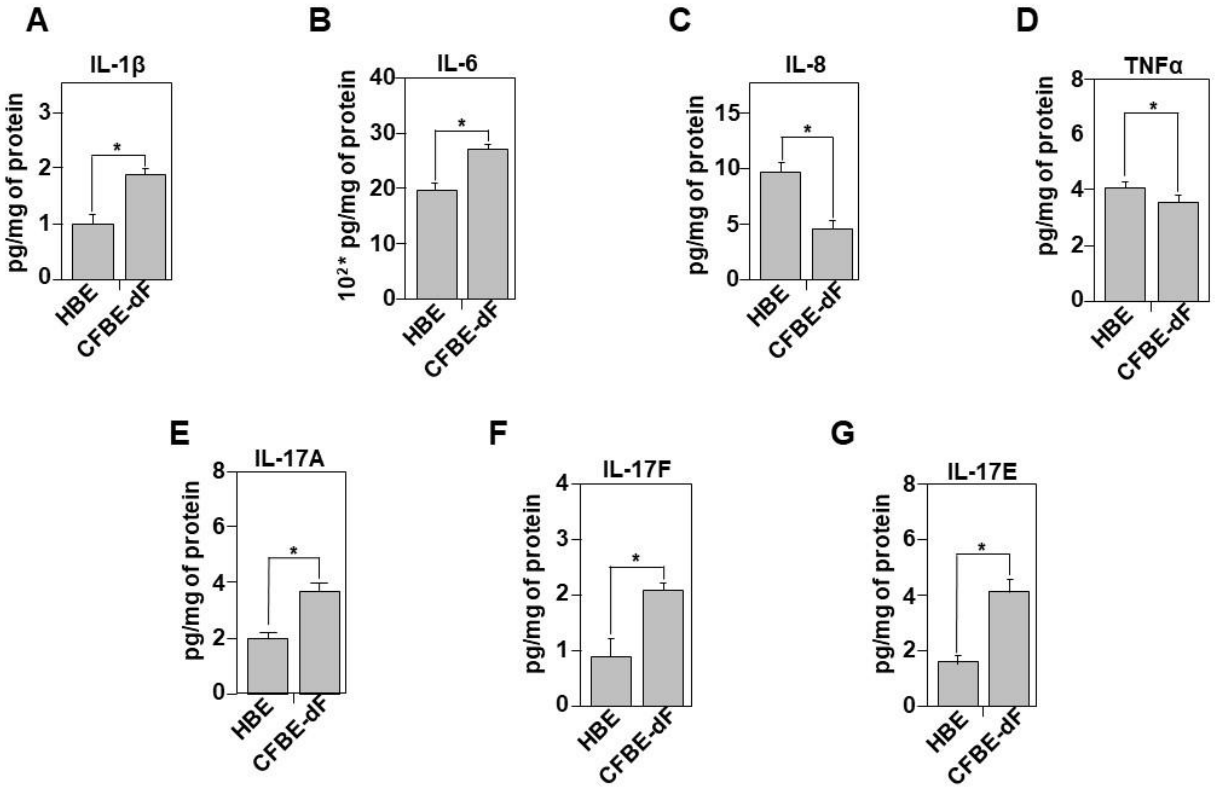


Figure 4

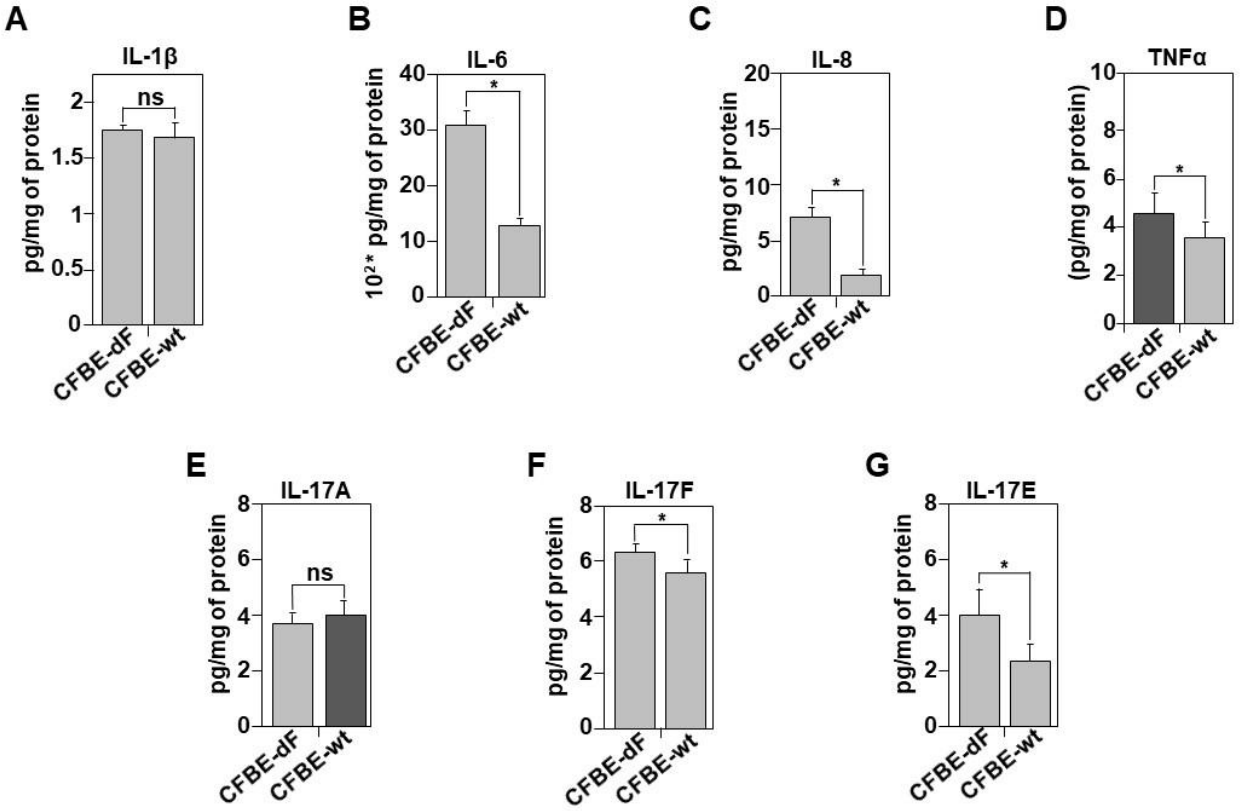


Figure 5

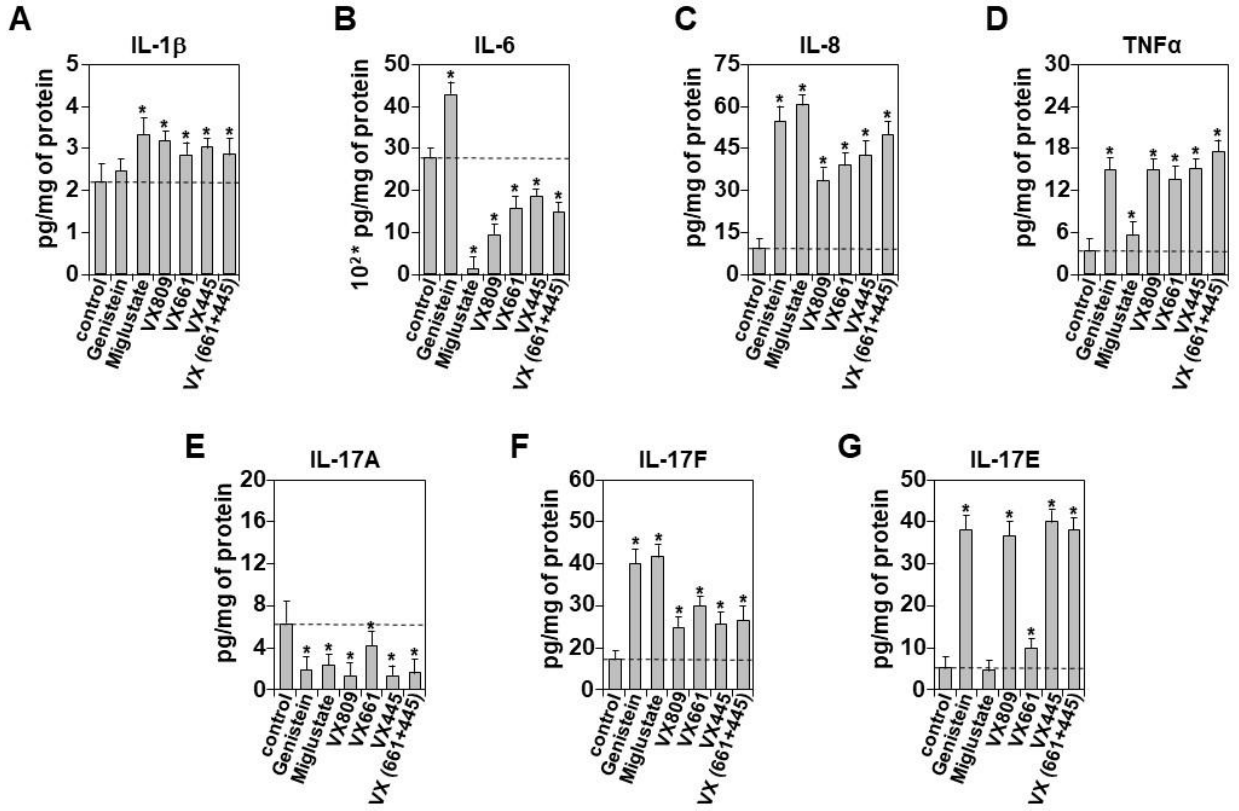
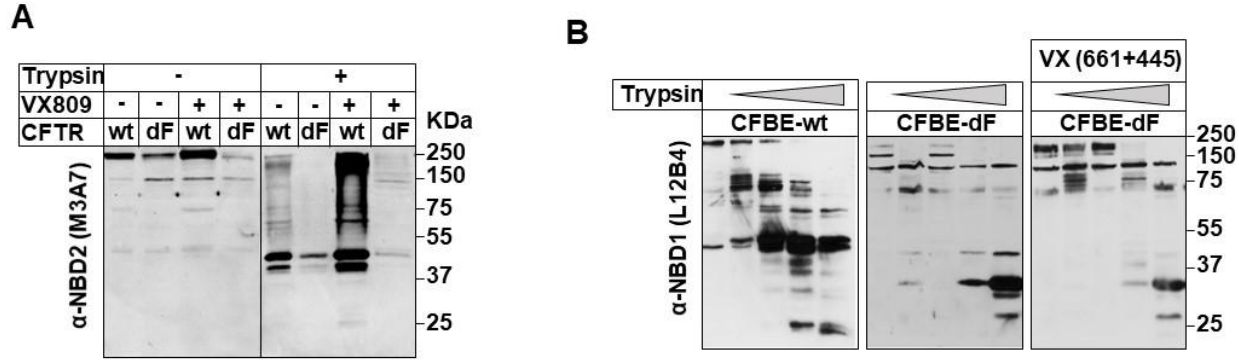


Figure 6



Supplementary Data

Figure S1

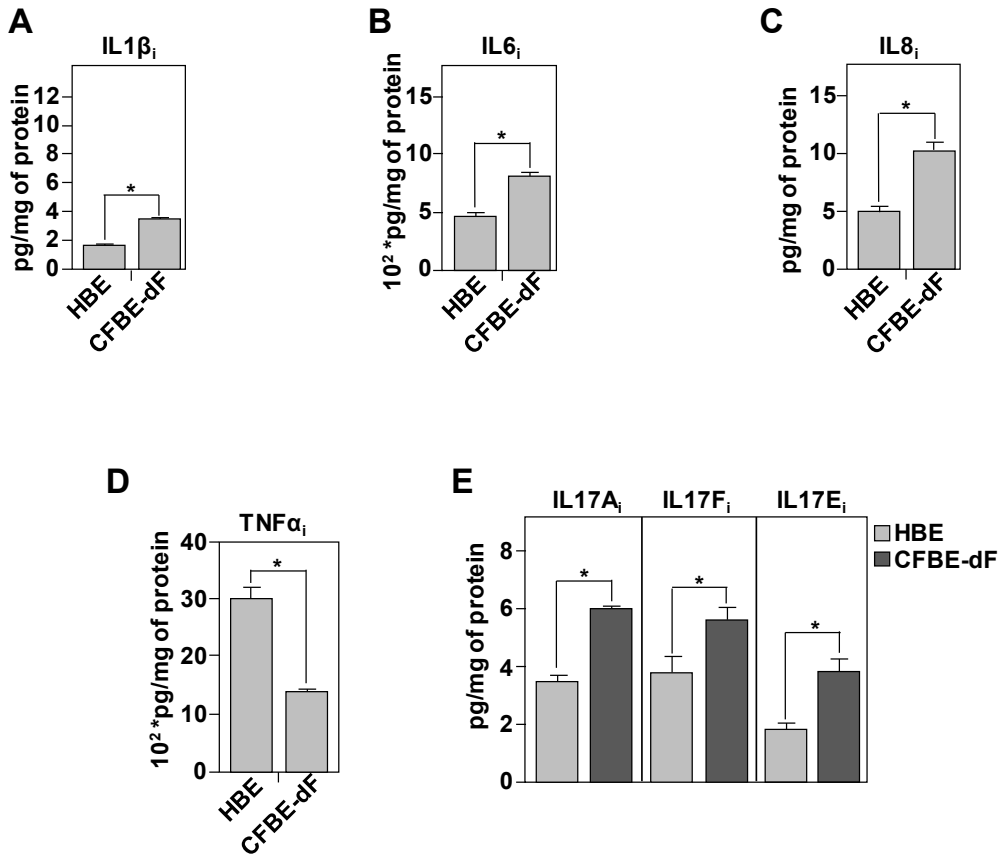


Figure S1: Inflammation profiles of HBE and CFBE-dF cells

The inflammatory profile was evaluated using a quantitative sandwich enzyme-linked immunoassay (ELISA). Measurements of IL-1β (**A**), IL-6 (**B**), IL-8 (**C**), TNFα (**D**) and IL-17 (A, F, E) (**E**) were assessed in protein extracts (i) prepared from HBE (grey box) or CFBE-dF (black box) cells. Concentrations are in pg/mg of extracted proteins. Values overwritten with asterisk are different from the control ($p < 0.05$). Data are expressed as mean ± SE ($n = 7$)

Figure S2

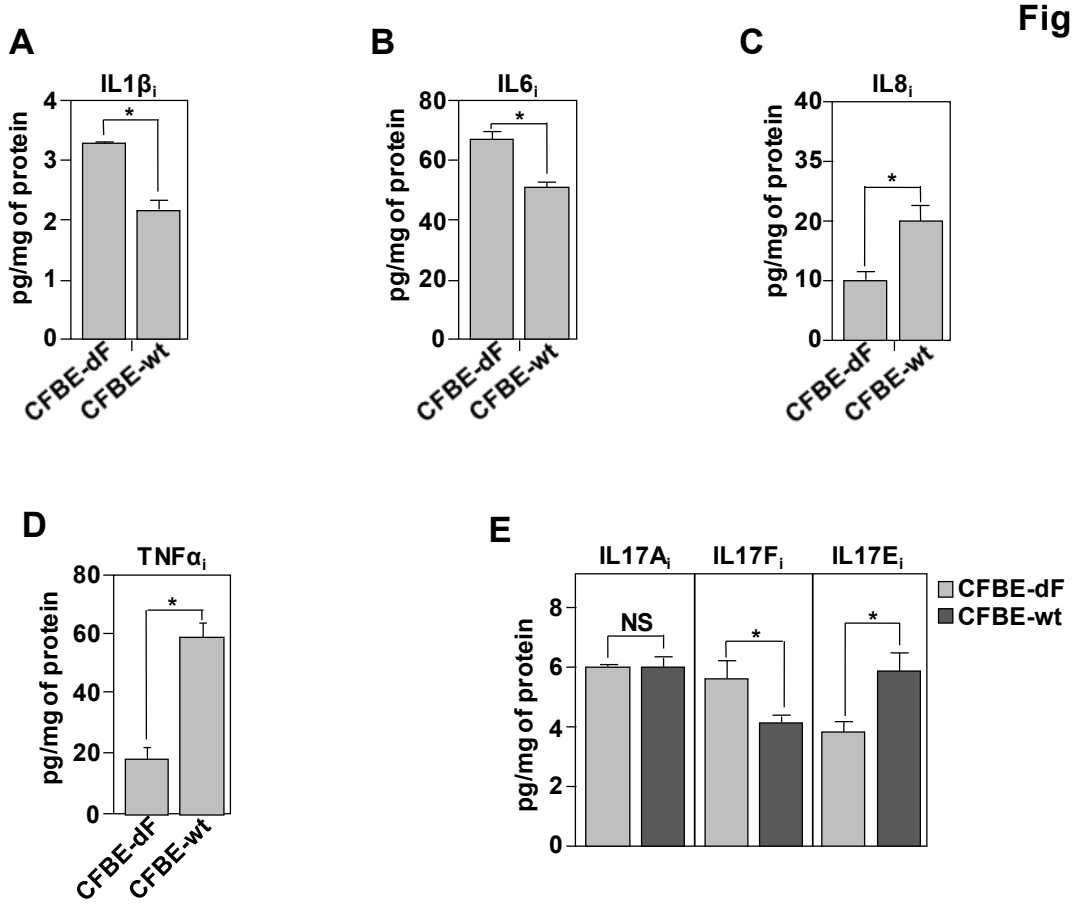


Figure S2: Comparative analysis of the production of inflammatory secretome in CFBE-dF and CFBE-wt Cells

The ELISA assay was used under the same conditions as described in Figure S1. Production (i) of IL-1β (**A**), IL-6 (**B**), IL-8 (**C**), TNFα (**D**) and IL-17 (A, F, E) (**E**) were evaluated in protein extracts prepared from CFBE-dF (grey box) or CFBE-wt (black box) cells, and expressed as pg/mg of protein extract. Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls ($P < 0.05$). Data are expressed as mean ± SE ($n = 7$).

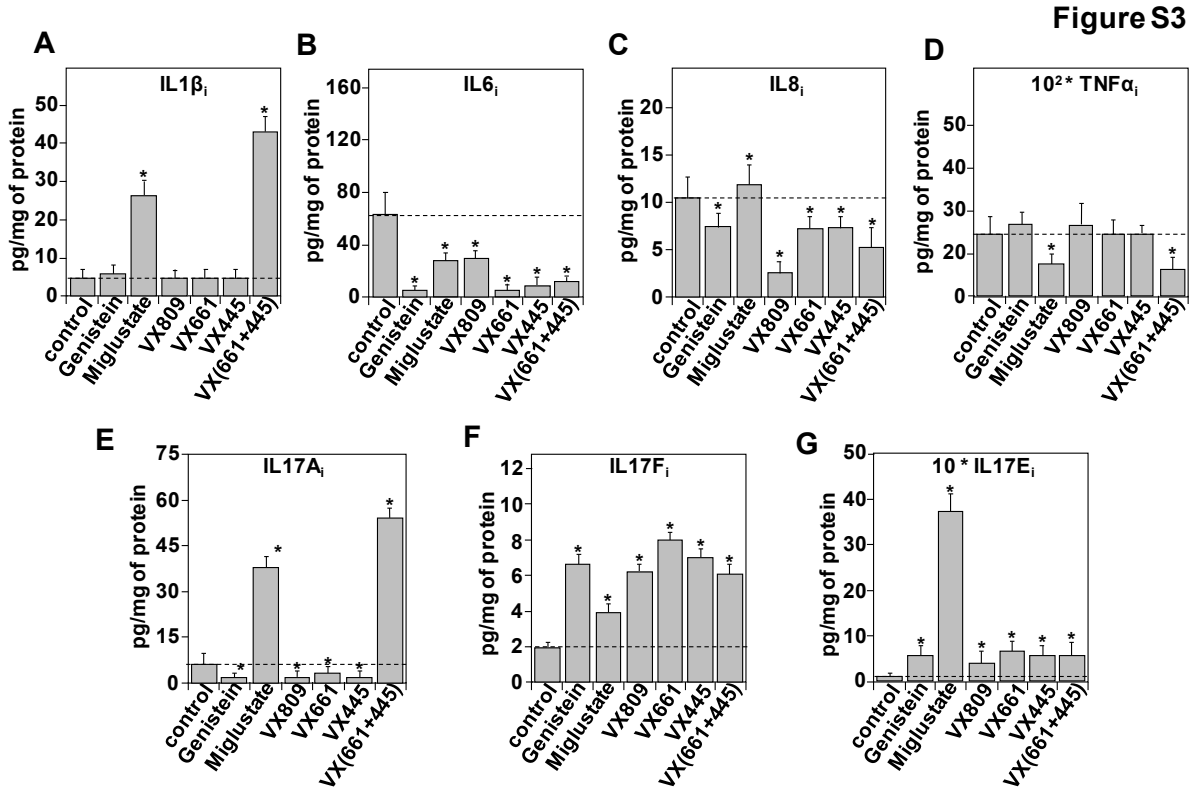


Figure S3: Impact of CFTR correctors on inflammation in CFBE-dF bronchial epithelial cells

Following 24h treatment of CFBE cells stably expressing CFTR-F508del (CFBE-dF) with the indicated correctors; genistein (50 μM), miglustat (200 μM), VX809 (3 μM), VX661 (18 μM), VX445 (3 μM) or VX445/VX661 (3 μM and 18 μM), protein extracts were prepared and tested for the production (i) of IL-1β (**A**), IL-6 (**B**), IL-8 (**C**), TNFα (**D**), IL-17A (**E**), IL-17F (**F**), and IL-17E (**G**) using ELISA assays. The results are reported in pg/mg of protein extract. Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls ($P < 0.05$). Data are expressed as mean ± SE (n = 7).

Discussion

Dans ce travail, nous avons cherché à évaluer si la restauration de la sécrétion des ions chlorure via la correction du défaut CFTR permettait d'atténuer la réponse inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques dans un contexte de mucoviscidose. Plus précisément, nous avons exploré l'impact du repliement de la protéine CFTR mutée (F508del) à la membrane plasmique sur la régulation de l'inflammation.

L'utilisation de cellules CFBE exprimant de manière stable la forme F508del-CFTR a permis de confirmer que leur profil inflammatoire était équivalent à celui des cellules CFBE parentales, ce qui valide l'intérêt de ce modèle pour l'étude conjointe des modulations CFTR et des réponses immunitaires. Deux approches ont été utilisées pour corriger la fonction CFTR : l'introduction directe de la forme sauvage (CFBE-wt) et le recours à des modulateurs pharmacologiques actuellement utilisés en clinique. Nous avons ainsi testé plusieurs molécules appartenant aux familles des correcteurs (VX-809, VX-661, VX-445) et des potentialisateurs (VX-770), seules ou en combinaison.

Nos résultats montrent que l'expression de la CFTR sauvage entraîne une diminution significative de la sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, notamment IL-6, IL-8, TNFα, IL-17F et IL-17E. Ces observations rejoignent celles de Veit et al. (2012), qui ont montré dans des cellules CFBE ΔF508 que l'induction de CFTR sauvage réduit de manière marquée la sécrétion d'IL-6, IL-8 et CXCL1/2. Ce parallèle suggère que la présence d'une CFTR correctement repliée et fonctionnelle à la membrane exerce un rôle direct de régulation négative sur l'activation inflammatoire basale des cellules épithéliales (Veit et al., 2012). Cette observation suggère que la présence de CFTR correctement repliée et fonctionnelle à la membrane permet non seulement la restauration du transport ionique, mais également une modulation plus large de la signalisation inflammatoire. À l'inverse, les traitements avec les modulateurs pharmacologiques, bien qu'ils permettent une augmentation de la maturation de CFTR (bande C) et de sa fonction, n'ont pas permis une normalisation complète du profil inflammatoire. Veit et al. (2012) montrent que seule la CFTR fonctionnelle (et pas G551D-CFTR) réduit IL-8, ce qui indique que la restauration partielle par modulateurs ne suffit pas.

Ils observent aussi que l'effet dépend du niveau de correction et du contexte cellulaire.

En effet, seule une réduction partielle de certaines cytokines comme IL-6 et IL-17A a été observée. D'autres cytokines ont même vu leur sécrétion augmenter après traitement, suggérant que la simple restauration du transport ionique ne suffit pas à corriger les anomalies

inflammatoires. Ces résultats plaident en faveur d'un lien entre la conformation structurale fine de CFTR et sa capacité à interagir avec les voies de régulation inflammatoire intracellulaires. Les données de Veit et al. (2012) montrant que la simple présence de CFTR non fonctionnelle (G551D) n'a aucun effet.

L'effet modéré des modulateurs peut s'expliquer par la persistance d'anomalies de repliement, malgré la présence de la forme mature de CFTR à la membrane. Des essais de sensibilité aux protéases in situ ont en effet mis en évidence une différence de stabilité structurelle entre la CFTR corrigée pharmacologiquement et la CFTR sauvage. Cette instabilité résiduelle pourrait compromettre l'interaction de CFTR avec des partenaires protéiques impliqués dans le contrôle de l'inflammation. Ainsi, même lorsque la fonction canal est partiellement restaurée, les défauts de structure persistent et limitent les effets thérapeutiques globaux sur l'environnement cellulaire.

Cette hypothèse est renforcée par des observations faites en conditions inflammatoires : malgré une augmentation du transport ionique, la correction reste incomplète, ce qui suggère que certains signaux inflammatoires ou stress cellulaires peuvent interférer avec le bon adressage ou la stabilisation de CFTR muté. Par ailleurs, les effets variables des différents modulateurs, seuls ou en combinaison, illustrent la complexité de leur mode d'action, qui dépend fortement du contexte cellulaire, du niveau de correction atteint, et de la nature des défauts moléculaires à corriger.

Nos résultats suggèrent donc que la pleine restauration de la fonction CFTR ne peut être atteinte uniquement par des correcteurs de repliement ou des potentialisateurs. Il semble nécessaire de considérer la conformation native complète de la protéine comme un déterminant essentiel de ses fonctions extra-canales, notamment dans la régulation des voies inflammatoires.

La seule présence de la bande C ne garantit pas une correction fonctionnelle globale. Cela remet en question l'utilisation de marqueurs simplifiés comme critères uniques de succès thérapeutique.

Enfin, ces résultats s'inscrivent dans un ensemble d'observations montrant que les modulateurs CFTR, au-delà de leur action sur la fonction canal, peuvent avoir des effets partiels, voire ambivalents, sur l'environnement inflammatoire. L'idée d'une boucle de rétrocontrôle entre l'état inflammatoire et la stabilité de CFTR gagne ainsi en pertinence. Il est possible que l'inflammation chronique propre à la mucoviscidose maintienne une pression de stress cellulaire incompatible avec une correction efficace et durable.

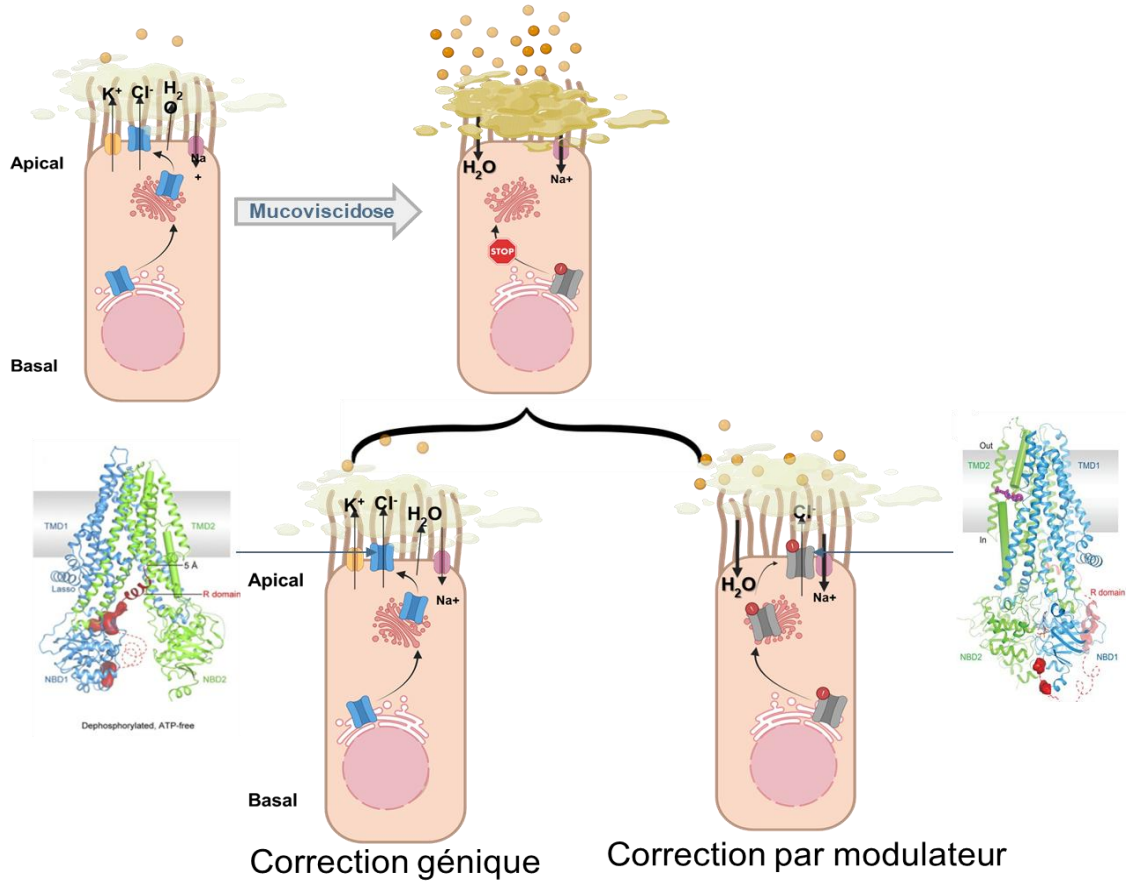


Figure 30: Restauration de CFTR et modulation de la réponse inflammatoire dans la mucoviscidose. *(Source : Liu et al., 2019; Zhang et al., 2018)*
Ce schéma illustre les effets de la mucoviscidose sur l'épithélium bronchique et les stratégies thérapeutiques visant à restaurer la fonction de CFTR. En haut, la mutation F508del-CFTR entraîne un défaut de transport des ions Cl^- et une déshydratation du mucus, favorisant l'inflammation chronique. Deux approches sont représentées en bas : À gauche, les modulateurs pharmacologiques (correcteurs et potentiateurs) partiellement restaurent le transport ionique mais n'induisent qu'une réduction incomplète de la réponse inflammatoire, en raison de défauts persistants de repliement et de stabilité structurale de CFTR.À droite, la correction génique via l'introduction de CFTR sauvage permet une restauration plus complète, associée à une diminution significative de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TNFα, IL-17).Cette figure met en évidence le lien étroit entre la conformation native de CFTR et sa capacité à moduler les voies inflammatoires, suggérant que la correction de la mucoviscidose nécessite une prise en compte conjointe des fonctions canalaires et extra-canalaires de la protéine.

Conclusion et perspectives

Dans l'ensemble, notre étude met en évidence que la restauration du transport ionique via des modulateurs de CFTR permet une amélioration partielle de la réponse inflammatoire des cellules bronchiques atteintes de mucoviscidose. Cependant, cette amélioration reste limitée, probablement en raison de défauts persistants dans la structure et la stabilité de la protéine F508del-CFTR, même après correction.

Ces données confortent l'idée selon laquelle une conformation pleinement native de CFTR est indispensable pour réguler efficacement les voies inflammatoires associées à la mucoviscidose. L'atteinte de cet objectif nécessitera sans doute des stratégies combinées, associant modulateurs de repliement, stabilisateurs, et anti-inflammatoires ciblés. Le développement de molécules capables d'assurer non seulement l'adressage membranaire mais aussi la stabilisation structurelle complète de CFTR, tout en modulant les signaux inflammatoires intracellulaires, représente un axe thérapeutique prioritaire.

Article 2

Introduction

Les prokinéticines (PKs) constituent une famille de petites protéines sécrétées (~10 kDa), riches en cystéines, initialement identifiées pour leur capacité à induire des contractions puissantes des muscles lisses gastro-intestinaux, via un influx calcique intracellulaire (Li et al., 2001b). Elles sont aujourd'hui représentées par deux principaux membres : la prokinéticine-1 (PROK1), également connue sous le nom de facteur de croissance endothélial dérivé des glandes endocrines (EG-VEGF), et la prokinéticine-2 (PROK2 ou Bv8). Ces protéines présentent une forte homologie structurale avec des peptides issus du venin de serpents ou de la peau d'amphibiens, et partagent cinq ponts disulfures conservés, essentiels à leur activité biologique (LeCouter et al., 2001).

D'abord cantonnées au rôle de régulateurs du péristaltisme intestinal, les prokinéticines ont vu leur champ d'action considérablement élargi ces deux dernières décennies. Elles sont désormais reconnues comme des acteurs importants de l'angiogenèse, de l'immunomodulation, et du développement embryonnaire. Leur activité repose sur l'activation de deux récepteurs membranaires couplés aux protéines G (GPCRs), PROKR1 et PROKR2 (Lin et al., 2002b; Masuda et al., 2002). Ces récepteurs sont exprimés de manière différentielle selon les tissus – y compris dans les cellules endothéliales, cellules du système nerveux, immunitaires et reproductives, et activent des voies de signalisation intracellulaire variées telles que la mobilisation du calcium, les cascades MAPK/ERK, ou le métabolisme des phosphoinositides (Guilini et al., 2010). Des études ont également mis en évidence une spécialisation fonctionnelle contextuelle entre PROKR1 et PROKR2, qui pourraient jouer des rôles distincts selon le tissu ou le type cellulaire impliqué (Brouillet et al., 2010, 2012; Podlovni et al., 2006).

Parmi les rôles les mieux établis de PROK1, on compte son activité angiogénique dans les tissus endothéliaux, où il stimule la prolifération, la migration et la fenestration des cellules endothéliales (LeCouter & Ferrara, 2003; Masuda et al., 2002). Son expression est particulièrement élevée dans les organes reproducteurs, tels que le corps jaune, le liquide folliculaire ou le placenta, où il participe aux remaniements vasculaires cycliques (Alfaidy, 2016; Hoffmann et al., 2006; Kisliouk et al., 2005). En parallèle, PROK2 semble jouer un rôle plus marqué dans la régulation de l'inflammation et des réponses immunitaires, notamment via la différenciation monocytaire, la production de cytokines, ou encore le recrutement des leucocytes (Dorsch et al., 2005; Monnier & Samson, 2008).

Malgré cette littérature abondante, le rôle des prokinéticines dans un organe hautement vascularisé comme le poumon, et en particulier au niveau de ses cellules endothéliales microvasculaires (HPMEC ; Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells), reste largement inexploré. Ces cellules constituent pourtant un compartiment clé dans le maintien de l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire, et sont fortement impliquées dans les processus physiologiques, mais aussi pathologiques pulmonaires telles que le syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS), l'asthme, la BPCO, la mucoviscidose ou encore les métastases pulmonaires (Chauvet et al., 2015; Klosterhalfen et al., 1996; Lehr et al., 2000).De par leur nature endothéliale, leur capacité angiogénique, et leur sensibilité aux stimulations inflammatoires et hypoxiques, les HPMEC apparaissent comme une cible plausible des prokinéticines, notamment dans les contextes pathologiques de remodelage vasculaire.

Par ailleurs, les signaux connus pour réguler l'expression des prokinéticines dans d'autres tissus comme l'hypoxie, l'inflammation, les signaux hormonaux, ainsi que l'infection sont également au cœur de la régulation vasculaire pulmonaire. Cela laisse envisager que ces peptides pourraient jouer un rôle encore sous-estimé dans la modulation de la perméabilité vasculaire, l'activation endothéliale, ou les interactions immuno-vasculaires pulmonaires (Urayama et al., 2008 ; Hoffmann et al., 2006).

Dans ce travail, nous avons utilisé une lignée cellulaire « endothélial-like » pour caractériser de manière fonctionnelle et temporelle leur maturation, en nous focalisant sur l'acquisition progressive de leurs propriétés de barrière. Pour cela, nous avons étudié leur comportement à différents stades de la culture (J+1, J+3, J+11) et en réponse à des stimuli pro-inflammatoires (cytomix), infectieux (LPS), et pro-angiogéniques (PROK1). Nous avons évalué l'impact de ces conditions sur la résistance électrique transendothéliale, la production de cytokines inflammatoires, la structure des jonctions intercellulaires, et la capacité des cellules à interagir avec des cellules immunitaires neutrophilaires.

Notre objectif était double : i) mieux comprendre les mécanismes de dysfonctionnement endothélial dans les pathologies inflammatoires pulmonaires, et **ii)** explorer, pour la première fois, le rôle potentiel de l'axe PROK1/PROKRs dans l'altération de la barrière vasculaire pulmonaire.

PROK1 Enhances Leukocyte Transmigration and Barrier Disruption in Pulmonary Endothelial Cells During Inflammation

Camille Lyko[1,2,3], Mélanie Boudaud[1,2,3], Nicolas Lemaitre, Martial Delion, Johanna Cormenier[1,2,3], Kevin Gemy[1,2,3], Nadia Alfaidy[1,2,3], and Mohamed Benharouga[1,2,3].

[1] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1292, Laboratoire de BioSanté, Grenoble, France.

[2] Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), DSV-IRIG, Grenoble, France.

[3] Université Grenoble Alpes (UGA), Grenoble, France.

Running Title: PROK1 and Leukocyte Transmigration in Lung Endothelium

Address correspondence:
Mohamed Benharouga, PhD, HDR
BioSanté/MAB2-INSERM U1292
IRiG, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, F-38054, Grenoble cedex 09, France
Phone : (+33) 4-38-78-01-17
E-mail : mohamed.benharouga@univ-grenoble-alpes.fr

Abstract (200 words)

Prokineticin-1 (PROK1), is a secreted cytokine with angiogenic and immunomodulatory properties. While well studied in reproductive and tumor vascular biology, its role in pulmonary microvascular responses to inflammation and infection remains poorly understood. The pulmonary endothelium is central to vascular homeostasis and immune responses, and human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMECs) provide a relevant model to study these mechanisms *in vitro*. Using the HPMEC-ST1.6R cell line, we characterized the time-dependent maturation of the endothelial barrier and assessed its responses to pro-inflammatory (cytomix), infectious (LPS), and PROK1 stimuli. Over 11 days of culture, HPMECs developed a mature phenotype marked by increased TEER, reduced permeability, angiogenic capability, and upregulation of junctional proteins. Intermediate stages (day 3) showed higher sensitivity to inflammatory stimuli, while mature barrier (day 11) was relatively resistant.

We identified PROK1 as a novel regulator of pulmonary endothelial function. It disrupts barrier integrity, induces cytokine release, alters junctional architecture, and promotes HL-60 leukocyte adhesion and transmigration. Its receptors, PROKR1 and PROKR2, are differentially expressed during maturation and significantly modulated by inflammation.

These findings highlight PROK1 as a potential target in pulmonary vascular inflammation and validate HPMEC-ST1.6R as a robust model to study endothelial responses in lung disease.

Introduction

Prokineticins (PROKs) family includes two key members, prokineticin-1 (PROK1, also known as endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor or EG-VEGF) and prokineticin-2 (PROK2 or Bv8). PROK1 and PROK2 are secreted proteins that were initially identified for their ability to induce strong contractions in gastrointestinal smooth muscle through calcium influx mechanisms (1). These small (~10 kDa), cysteine-rich proteins share structural homology with venom-derived and amphibian skin peptides and possess five conserved disulfide bridges critical for their biological functions (2).

Subsequent research expanded the role of prokineticins beyond gastrointestinal physiology to include key angiogenic, immunomodulatory, and developmental functions (3). PROK1 and PROK2 exert their effects through two closely related G protein-coupled receptors (GPCRs), PROKR1 and PROKR2 (4,5). These receptors are differentially expressed in various tissues, including endothelial, neural, immune, and reproductive cells, and activate multiple intracellular signaling cascades such as calcium pathway, MAPK/ERK, and phosphoinositide turnover (4,6). Functional divergence between PROKR1 and PROKR2 has been observed depending on the tissue and cellular context (7,8).

A growing body of evidence supports the angiogenic potential of prokineticins, particularly in endothelial cells of endocrine organs, where PROK1 stimulates proliferation, migration, and fenestration (2,5,8). Notably, in reproductive tissues such as the corpus luteum and placenta, where PROK1 was reported to be highly expressed in endothelial cells and contributes to cyclic vascular remodeling (8–10). In addition to their angiogenic activity, prokineticins modulate inflammation and immune responses, influencing monocyte differentiation, cytokine production, and leukocyte recruitment, particularly via PROK2/Bv8 (11–13).

Despite these advances, the expression and functional role of prokineticins in the highly vascularized and inflammation-prone lung remain largely unexplored. Hence, we hypothesized that PROK1 may control central processes of lung microvascular integrity and its response to insults such as inflammation and infection.

Human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMECs) are critical for maintaining lung microvascular integrity and are implicated in various pathologies such as acute respiratory distress syndrome (ARDS), asthma, COPD, cystic fibrosis, and lung metastasis (14,15), however their response to physiological or pathological regulators of endothelial barrier remain poorly characterized. Given the endothelial-like angiogenic phenotype of HPMECs and their responsiveness to inflammatory and hypoxic stimuli, we supposed that prokineticins may contribute to their remodeling under both physiological and pathological conditions.

Moreover, emerging data indicate that hypoxia, inflammation, and hormonal signals that are key regulators of prokineticin expression in endocrine and reproductive tissues, are also central to pulmonary diseases(9,10). The ability of PROK1 to drive angiogenesis, alter tight junctions, and regulate immune-endothelial cell interactions suggest a potentially unexplored role of this factor in the lung microvasculature (6,8).

In this study, we investigated the phenotypic and functional evolution of HPMECs cultured for 1, 3, and 11 days, focusing on the progressive acquisition of endothelial barrier properties. We evaluated their responses to inflammatory (cytomix) and infectious (LPS) stimuli, as well as their response to PROK1 exposure. We further examined the impact of these treatments on barrier function, inflammatory cytokine production, and interactions with immune cells, including transmigration of leucocytes.

This study explored the role of the PROK1 signaling axis in pulmonary endothelial dysfunction and provide novel insights into its contribution to inflammation-induced vascular remodeling.

Material and Methods

Cell Culture

The human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMEC-ST1.6R) kwon as HPMEC cells was a generous gift from Pr. James Kirkpatrick laboratory (Institute of Pathology, Johannes Gutenberg University, Germany). HPMEC cells were cultured in endothelial Cell growth medium EBM (Endothelial Basal Medium, Lonza) supplemented with EGM®-2 SingleQuots® Supplements (Lonza) containing 0.04% Hydrocortisone, 0.4% hFGF-B (basic fibroblast growth factor), 0.1% VEGF, 0.1% R3-IGF-1, 0.1% Ascorbic Acid, 0.1% hEGF, 0.1% Heparin, and 0.1% GA-1000 (Gentamicin/Amphotericin-B). The medium was supplemented with 2% FBS (Foetal Bovine Serum, Gibco). All supports for culturing HPMEC cells were pre-coated with 0.2% gelatin. Medium 199 (Gibco) supplemented with 20% FBS (Gibco) was also used to culture HPMEC cells. For HL60 (Human Leukemia) cells, RPMI 1640-Glutamax medium (Gibco) supplemented with 20% FBS (Gibco) was used for culture. Both cell lines were maintained at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere and routinely tested for mycoplasma contamination.

Treatments

Cells were subjected to treatment with PROK1 (Peprotech), pro-inflammatory cocktail cytomix (10ng/ml de TNF-α, 10ng/ml d'IL-1β and 10ng/mL d'IFN-γ), and LPS (Lipopolysaccharide from pseudomonas Aeruginosa) at the concentration of 25 ng/ml, 10 ng/ml, and 100 ng/ml, respectively.

Trans-endothelial Electrical Resistance (TEER) Measurement of HPMEC Cells

Transwell inserts (Cellqart) were pre-coated with 0.2% gelatin. Briefly, inserts were filled with gelatin solution and incubated at 37 °C for 1 hour. Excess was aspirated, and inserts were allowed to dry under sterile conditions. Endothelial cells were seeded on the apical side of the coated inserts at a density of 2.5×10^5 cells/cm² in complete EBM medium. Cells were cultured TEER was measured at day 1 and every day at a fixed time using the EVOM3 device (World Precision Instruments) according to manufacturer instructions.

Permeability Assay

A 70 kDa dextran solution conjugated to FITC-labeled isothiocyanate-dextran (Sigma-Aldrich) was applied at a final concentration of 10 µM at the apical compartment of culture chambers.

After a 20-minutes of incubation at 37°C, fluorescence in the apical and basolateral compartments was measured using a Tecan Spark plate reader (TECAN) at wavelengths suitable for FITC (λex/λem correspond to ~495/~520 nm). Diffusive permeability (Po, in cm/s) was calculated using the following equation:Where **FL** is the fluorescence measured in the

$$Po = \frac{(FL/\Delta t) \cdot VL}{FA \cdot A}$$

basolateral compartment, **FA** is the initial fluorescence in the apical compartment, **Δt** is the time of incubation (20 min), **A** is the filter surface area (cm^2), and **VL** is the volume of the basolateral compartment (cm^3).

Immunofluorescence (IF)

The expression and localization of target proteins were analyzed using immunofluorescence. HMPEC cells were fixed, permeabilized and target proteins were detected using monoclonal anti-occludin (Sigma), anti-CD31 (Abcam), and polyclonal anti-VE-cadherin (16), anti-ZO-1 (Invitrogen), anti-PROKR1 (Covalab) and anti-PROKR2 (Covalab).

Antibody-antigen interactions were visualized using secondary antibodies conjugated to Alexa-488 or Alexa-546 fluorophores (Invitrogen). Images were acquired using a Zeiss epifluorescence microscope with a 63x oil immersion objective.

Proliferation Assay

On the day of the experiment, cells were seeded into 96-well plates at a density of 1×10^4 cells per well. Prior to treatment, wells were gently washed with PBS to remove any cellular debris. Treatments were then applied, and the plates were incubated in the CellCyteX imaging system (cytena). Images were acquired every 6 hours to monitor cell proliferation kinetics.

Migration Assay

The day before the experiment, cells were seeded in 96-well plates at 2×10^4 cells per well to achieve 100% confluence the following day. Treatments were prepared with a 1/1000 dilution of mitomycin (antibiotic used to inhibit proliferation). The Wound Maker device was washed thoroughly before creating wounds in the wells. After wounding, wells were washed with PBS to remove debris, and treatments were applied. Plates were incubated in the CellCyteX imaging system (cytena), with images acquired every 6 hours to track wound closure kinetics.

Pseudovascular Morphogenesis Assay

Chilled Matrigel (BD Biosciences) was dispensed into each well of a 96-well plate and allowed to solidify at 37°C for 1 hour. HPMEC cells ($4x10^4$ cells per well) were seeded and incubated at 37°C in a humidified 95% air/5% CO_2 atmosphere for 120 hours. Treatments were applied simultaneously with seeding. Images were captured hourly using the CellCyteX system (Cytena). Branching quantification was performed after 5 hours by counting the number of branching points formed in each well.

HL60 Cell Activation

HL60 cells were cultured at $2x10^5$ cells/mL and activated with 18.7 µg/mL of vitamin D3 and 10^{-7} M of indomethacin (Sigma-Aldrich) and incubated for 72 hours.

HL60 Cell Adhesion Assay

Following activation, HL60 cells were detached using a scraper and labelled with calcein AM (Invitrogen Molecular Probes) for 30 minutes at room temperature. Then, $1x10^6$ cells were allowed to adhere for 35 minutes on a confluent HPMEC monolayer. After three PBS washes, HPMEC and HL60 adherent cells were lysed with 1% of SDS. Lysates were plated in triplicate in a 96-well plate, and fluorescence was measured using a Tecan Spark plate reader (TECAN).

HL60 Cell Transmigration Assay

HPMEC cells ($5x10^5$ cells per well) were cultured to confluence on a 3 µm pore-size, translucent polyethylene terephthalate membrane (Cellqart) for 11 days at 37°C and stimulated with corresponding treatments for 18 hours before the assay. Activated HL60 cells (10^5 cells per well, activated with vitamin D3) were added to the upper compartment. IL-8 100 nM solution (R&D Systems) was added to the lower compartment to create a chemotactic gradient for peripheral mononuclear cells. After 1 hour at 37°C, migrated HL60 cells were collected from the lower compartment, centrifuged, and quantified using a TC20 Automated Cell Counter (Biorad).

ELISA

Concentrations of PROK1, IL-6, and IL-8 in HPMEC culture medium were determined using ELISA kits (Peprotech). Three distinct standard curves were established to ensure reliable quantification across the detection ranges. Samples were analyzed without dilution. Absorbances were measured using a Spark ELISA reader (TECAN Group Ltd) at 405 nm for PROK1, with wavelength correction at 650 nm.

RNA Isolation, Reverse Transcription, and Real-Time RT-qPCR

Reverse Transcription

Total RNA extracted from HPMEC cells was used for reverse transcription wish was performed using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions.

Real-Time Quantitative PCR (qPCR)

Forward and reverse primers were prepared from stocks to achieve a final concentration of 10 µM. Primer sequences are listed in Table 1. For each primer pair, a reaction mix was prepared with SYBR® Green (Bio-Rad) to achieve a final concentration of 1 µM. Reaction mixes and samples were loaded onto a sealed PCR plate and amplified in a thermocycler for real-time fluorescence detection.

Table 1. Primer Sequences for qPCR

Gene	Primer Sequence (Forward (F) / Reverse (R))	Number of Nucleotides	Accession Number
PROKR1	**F:** GCTCTGGTTCGCAGGTTGAA	20	NM_138964.4
	R: GCAAGGTTGACGACTCCTCT	20	
PROKR2	**F:** TCCTGGCTCTTAGCCGAATC	20	NM_144773.4
	R: GGGTGATGAATCCTGCTGACA	21	
vWF	**F:** AGTTCATGGAGGAGGTGATTCAGC	24	NM_000552.1
	R: AGCCATCCAGGAGAAGGATCACG	23	
CD31	**F:** TCCCACGCCAAAATGTTAAGTGAG	24	L34640
	R: GATCAAGAGAGCAATGATCACTCC	24	
CD34	**F:** GCGCTTTGCTTGCTGAGTTTGC	22	M81938
	R: GCCTCATGCCATGTTGAGACAC	23	
VEGFR2	**F:** GTG ACCAACATGGAGTCGTG	20	NM_002253.4
	R: TGCTTCACAGAAGACCATGC	20	
VE-Cadherin	**F:** CGCCTCTGTCATGTACCAA	19	AF240635
	R: GTAAACAGCACGGACTTCTG	20	
β-Catenin	**F:** TACTGCCCCACCATGACC	18	NM_001438871
	R: GGACTCGAAGCGCACATC	18	
ZO-1	**F:** AAAGAGTGAACCACGAGACGC T	22	NM_001330239
	R: AAAGGTAAGGGACTGGAGATGA	22	
Occludin	**F:** GTCTAGGACGCAGCAGATTGG	21	NM_002538
	R: GCCTGGATGACATGGCTGATT	21	
GAPDH	**F:** CATCACTGCCACCCAGAAG	19	NM_002046
	R: ATGCCAGTGAGCTTCCCGT	19	

Western Blot (WB)

Protein extracts from HPMEC or HL60 cells were prepared using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Triton X-100) supplemented with protease inhibitors (10 mM PMSF, 2 µM leupeptin/pepstatin A, 2 mg/mL iodoacetamide). Proteins were denatured using Laemmli Sample Buffer, separated by 10% acrylamide gel electrophoresis, and transferred to a nitrocellulose membrane. Target proteins were detected using monoclonal anti-occludin (Sigma), anti-CD31 (Abcam), anti-CD34 (Abcam), anti-VEGRF2 (Cell Signaling), anti-vWf (Dako), anti-VE-cadherin (16) and polyclonal anti-β-catenin (Sigma), anti-ZO-1 (Invitrogen), anti-PROKR1 (Covalab) and anti-

PROKR2 (Covalab). Primary antibodies were detected using HRP-conjugated secondary anti-mouse or anti rabbit antibodies (Covalab, France). Detection was performed using ECL solution (Bio-Rad) and the iBright imaging system (Thermo Fisher).

Statistical Analysis

Differences between mean values were compared by Student's unpaired two-tailed t-tests using GraphPad Prism Software. Data are expressed as mean ± SEM, unless otherwise indicated. Significance was set at a two-tailed p value of 0.05. An asterisk indicates a statistically significant difference relative to the control group

Results

In Vitro Temporal Maturation of Functional HPMEC Endothelium

Relevant cell culture models are essential for studying the pathobiology of the pulmonary microvascular endothelium and understanding the effects of inflammation and infection, a key feature of bronchial diseases such as COPD, COVID-19, asthma, and cystic fibrosis (14,15,17,18).

One such model is the human pulmonary microvascular endothelial cell line (HPMEC-ST1.6R), developed by Professor Kirkpatrick group, and commonly referred to as HPMEC (19). We used this cellular model in our study. However, it is well established that some cell lines, after multiple passages and freeze/thaw cycles, may lose certain original characteristics, thereby diverging from the parental phenotype (20). To ensure that the HPMEC cell line, generously provided by Professor Kirkpatrick's laboratory, retained its original characteristics comparable to the parental cells (19), we conducted a comprehensive evaluation of the physical, molecular, and functional parameters of the HPMEC cells. To assess the maturation of HPMEC, cells were cultured for 1 to 25 days and several functional parameters were measured. Fig. 1A shows that trans-endothelial electrical resistance (TEER) significantly increased from day 1, to day 11, where it reached a plateau that was stable for 14 days of culture, indicating a progressive improvement in the integrity of the endothelial barrier. Conversely, transcellular permeability decreased proportionally, and was at its lowest levels by day 13, suggesting tighter intercellular junctions over this period of time (Fig. 1A). The ability of HPMEC to organize into tubular networks with branched morphology, an indicator of endothelial function (21) , was assessed after 5 hours using two-dimensional (2D) culture system. HPMECs cultured on fibronectin-coated supports were imaged over a 5-hours period, with photographs taken every 30 minutes. After 5 hours, cells organized into well-defined angiogenic networks (Fig. 1B).

Quantification of the number of branches per image revealed an increase in branch formation over time, reaching approximately 7 ± 0.7 branches per image at 5 hours (Fig. 1C), demonstrating the ability of these cells to differentiate toward a tube-like vascular phenotype.

Time-dependent increase in endothelial and junctional marker expression

HPMECs play a central role in maintaining vascular integrity, gas exchange, and regulating inflammatory and angiogenic responses in the lung (22). Their identification relies on the expression of endothelial-specific markers indicative of their origin and functional state. Key markers include von Willebrand factor (vWf), a high-molecular-weight glycoprotein involved in hemostasis and characteristic of mature endothelial cells (23); CD31 (PECAM-1), an adhesion molecule critical for junctional integrity and leukocyte transmigration (24); CD34, a transmembrane glycoprotein expressed on microvascular endothelial and progenitor cells (25); and VEGFR2 (Flk-1/KDR), a receptor essential for endothelial proliferation and angiogenesis, in response to VEGF signaling (26). To confirm HPMEC identity, purity, and angiogenic potential *in vitro*, we performed a combined analysis of these markers. To assess the temporal dynamics of endothelial barrier maturation, we selected three culture time points; day 1, day 3, and day 11, based on published studies describing the time-dependent establishment of endothelial junctions (27–31). These conditions capture distinct phases of endothelial maturation, from initial adhesion, to barrier formation, and finally to a fully mature and functional endothelial layer. These stages are critical for interpreting changes in endothelial function and permeability in response to physiological or pathological stimuli.

First, we assessed cell number at day 1, day 3, and day 11 of culture. Our results showed that HPMEC counts remain comparable between day 1 and day 3 (Fig. S1A). By day 11, this number had doubled (~15×10^6) compared to day 3 (~7.5×10^6), indicating that HPMECs exhibit a significant proliferative capacity only after 3 days in culture. We then examined the expression of key endothelial markers by immunoblot. We showed that protein levels of vWf, CD31, CD34 and VEGFR2 increased progressively over time (Fig. 2B–D). Quantification using ImageJ confirmed these changes. Similar patterns were observed using quantitative RT-PCR, indicating transcriptional regulation (Fig. 2E–H). Endothelial cells form a highly selective barrier that regulates the transport of nutrients, gases, and passage of innate immune cells, such as neutrophils, from the bloodstream to surrounding tissues. This barrier is characterized by high transendothelial electrical resistance (TER) and low transcellular permeability, both of which are hallmarks of a functional endothelium. These properties depend on the progressive formation of tight and adherens junctions, involving key junctional proteins such as Occludin, ZO-1, VE-cadherin, and β-catenin (27,29).

We evaluated the expression of endothelial junctional proteins at days 1, 3, and 11 of culture using quantitative RT-PCR, immunoblotting, and immunofluorescence. Both transcriptional and post-translational levels of occludin and ZO-1 (tight junction markers), as well as VE-cadherin and β-catenin (adherens junction markers), increased significantly over time (Fig. 3A-H). Immunofluorescence analyses on fixed and permeabilized cells confirmed these findings, as a progressive increase in junctional localization was observed with culture duration (Fig.S1B). A similar expression pattern was observed for CD31, further supporting endothelial identity and maturation (Fig. S1B). Altogether, these results highlight a strong temporal correlation between the progressive establishment of the endothelial barrier, evidenced by increasing TEER values (Fig. 1A), and the upregulation of key junctional and endothelial-specific proteins in HPMECs. Based on these results, we selected 1, 3, and 11 days of culture as key time points for our upcoming experiments.

Infection (LPS) and inflammation (cytomix) impair the endothelial barrier and trigger cytokine secretion

Inflammation and infection compromise endothelial barrier integrity by inducing disassembly of junctional proteins (e.g., VE-cadherin), and increased cytokine release (IL-6, IL-8) (27,32–34). Here, we examined first the effect of LPS and cytomix (CytX) on HPMECs at 1, 3, and 11 days of culture to provide insight into how their maturation state influences their response to CytX and LPS, particularly in regards to barrier integrity and cytokine secretion. We first confirmed that neither treatment affected cell viability or induced toxicity. As shown in Figure S2A, incubation of HPMECs with LPS or CytX did not result in significant cytotoxicity compared to untreated cells. Treatment of HPMEC after 1, 3, or 11 days of culture with LPS or CytX did not exhibit the same effects on trans-endothelial electrical resistance (TEER). While both treatments showed slight but significant decrease in the TEER after 1 day of culture (Fig. 4A, D), the effect became much stronger at 3 days, leading to an almost complete inhibition of junction formation (Fig. 4B and 4D). At 11 days of culture, corresponding to a mature endothelial monolayer, the effect was still present but less pronounced than at 3 days and more intense than at 1 day (Fig. 4C and 4D). These findings, for the first time, highlight the critical role of endothelial cell maturation in resisting inflammatory and/or infectious processes associated with pulmonary pathologies. A decrease in TEER is closely linked to the disorganization of tight and adherens junction proteins, as well as endothelial-specific markers such as CD31 (PECAM-1) (27,35).

Monitoring TEER alongside these junctional components provides key insights into endothelial barrier dysfunction under inflammatory or infectious conditions (36) .

We focused on two key junctional proteins; occludin (Occ) and VE-cadherin (VE-Cad), representative of tight and adherens junctions, respectively. We assessed their expression by immunoblotting in 11-day cultured HPMEC following treatment with LPS or CytX at indicated time points.

Our results reveal an overtime decrease in the expression of both proteins in response to LPS or CytX (Fig. 5A-D). Immunofluorescence analysis further confirmed this reduction and highlighted a pronounced disorganization of the VE-cadherin and CD31 networks after LPS and CytX treatments (Fig. S2B). These observations were consistently made at 11 days of culture and after 72 hours of exposure.

Endothelial cells are known to respond to infection and inflammation by producing and secreting pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-8 (37,38). However, for HPMEC, few studies have examined this response, particularly in the context of the establishment of a mature and functional endothelium. We therefore measured IL-6 and IL-8 secretion following treatment with LPS or CytX, at 1, 3, and 11 days of culture over the indicated treatment period.

While IL-6 and IL-8 secretion displayed similar profiles in HPMEC cultured for 1 or 11 days, cells cultured for 3 days secreted markedly higher levels of IL-6, particularly in response to CytX, reaching values of approximately 9,000 pg/mg of protein (Fig. 6A-D). These findings indicate that HPMEC exhibit a heightened inflammatory response when challenged, especially during the critical phase of junctional complex establishment. This is consistent with studies showing that immature endothelial monolayers are more sensitive to inflammatory stimuli due to incomplete junctional formation and barrier integrity (35,37).

PROK1 and their receptors (PROKR1/2) are expressed by HPMEC and modulated by inflammation

The involvement of prokineticins, particularly PROK1, in endothelial responses to inflammation and infection is well documented. PROK1, often regarded as a cytokine, is secreted by endothelial and epithelial cells upon inflammatory or infectious activation and plays key roles in angiogenesis, vascular permeability, and cell survival (13,39–41).

Through its receptor PROKR1, PROK1 modulates endothelial barrier function and inflammatory signaling, contributing to vascular remodeling in various pathophysiological contexts (8,42).

However, its precise role within the pulmonary microvascular endothelium, particularly during inflammatory and infectious challenges, remains largely unexplored.

First, we characterized the expression of the receptors PROKR1 and PROKR2, as well as the secretion of PROK1, under our HPMEC culture conditions. Using immunoblotting and immunofluorescence, we observed that PROKR1 expression in HPMEC progressively increased with culture duration, becoming significantly high at day 11, whereas PROKR2 expression markedly decreased at the same time point (Fig. S3A-B). Immunofluorescence confirmed these findings, showing that PROKR1 was localized both at the membrane and intracellularly, with a higher membrane-associated fraction at day 11, while PROKR2 remained predominantly cytoplasmic and decreased in abundance at day 11 (Fig. S3C). These data demonstrate, for the first time, that the regulation of the expression of PROKR1 and PROKR2 and their localization in pulmonary microvascular endothelium is dissimilar and strongly associated with endothelial maturation status. This aligns with prior studies indicating that prokineticin-mediated angiogenic activity and endothelial barrier dynamics involve PROKR1 receptor(39,40,42). For the ligand PROK1, quantitative RT-PCR revealed a marked increase in mRNA expression at 3 days of culture compared to day 1, followed by a drastic decrease at day 11 (Fig. S4A). Interestingly, the secretion pattern of PROK1 protein showed the opposite trend: PROK1 was barely detectable at day 1, peaked at day 3, and decreased by day 11 (Fig. S4B).

The regulation of prokineticin receptors (PROKR1 and PROKR2) by inflammatory or infectious stimuli remains poorly characterized, particularly for endothelial cells. For the pulmonary microvascular endothelium, no data are currently available. Here, we investigated how CtyX and LPS mediated inflammation modulate PROKR1/2 expression in HPMECs. We focused on cells cultured for 11 days, a stage at which endothelial junctions are mature and barrier properties are established. Following CytX or LPS treatment, PROKR1-positive cells decreased over time, reaching ~13% at 72 h with CytX and ~25% with LPS (Fig. 7A, B). In parallel, PROKR2 expression rose robustly, to ~220% and ~170% of baseline at 72 h in CytX- and LPS-treated cells, respectively (Fig. 7C, D).

PROK1 treatment disrupts the endothelial barrier and activates the inflammatory response

PROK1 is a secreted protein initially identified as a potent angiogenic and mitogenic factor for endothelial cells, particularly within endocrine tissues. Beyond its role in angiogenesis, PROK1 can modulate vascular permeability, endothelial survival, and inflammatory signaling through its G-protein coupled receptors PROKR1 and/or PROKR2.

Recent studies suggest that prokineticin signaling contributes to endothelial barrier disruption and inflammatory amplification (4,40,43–45) although its role in pulmonary microvascular endothelial cells remains poorly defined. Similar to the effects of LPS and CytX, exposure of HPMECs to PROK1 25 nM for up to 72h did not compromise cell viability or induced cytotoxicity (Fig. S5A). Treatment of HPMECs with PROK1 25 nM for the indicated time points significantly reduced TEER at 3 days of culture (Fig. 8B, S5B), reaching a maximum decrease of approximately 75% (Fig. S5B), thereby mimicking the barrier-disruptive effects observed with LPS and CytX. However, at 11 days of culture, PROK1 treatment induced a weaker reduction in TEER compared to LPS or CytX, even though the effect remained statistically significant (Fig. 8C, S5B). Specifically, TEER decreased by ~40% with PROK1, compared to ~60% with LPS and ~80% with CytX (Fig. S5B). The most striking result was observed at day 1, where PROK1 exposure led to a 90% increase in TEER relative to untreated controls (Fig. 8A), suggesting a transient barrier-enhancing effect prior to the subsequent disruption. Immunofluorescence analyses at day 11 confirmed the disruption of VE-cadherin and CD31 networks following PROK1 treatment (Fig. S5C), indicating a marked alteration of endothelial junctional architecture. This structural remodeling was associated with a significant increase in IL-6 and IL-8 secretion, particularly at day 1 of culture (Fig. 8D, E), suggesting a rapid activation of the inflammatory response. By day 3, the pro-inflammatory effect of PROK1 was less pronounced compared to LPS or CytX (Fig. 8D, E), pointing to distinct signaling mechanisms underlying barrier disruption. While LPS and CytX activate TLR4/NF-κB and STAT pathways, respectively, PROK1 signals through PROKR1/2 receptors, coupling to G-protein pathways (MAPK/ERK, PI3K/AKT) and potentially inducing barrier breakdown through VE-cadherin internalization and cytoskeletal rearrangement rather than direct cytotoxic stress. Finally, similar to the effects observed with LPS and CytX, treatment with PROK1 led to a downregulation of PROKR1 expression and an upregulation of PROKR2 (Fig 8F, G), suggesting a differential regulatory mechanism of the two receptors in response to inflammatory stimuli. This pattern is in line with previous findings showing that PROK1 (also known as EG-VEGF) can modulate its receptor expression in a context-dependent manner, with PROKR2 often being upregulated under inflammatory or angiogenic conditions (2,13).

Inflammation, infection, and PROK1 enhance HPMEC proliferation, migration, and invasion

Endothelial cells exhibit essential functional behaviors such as proliferation, migration, and invasion, all of which are regulated by a variety of angiogenic factors.

Among these is PROK1, which was identified as important modulator of angiogenesis and endothelial cell activity (2,46). However, the specific role of this factor in the regulation of pulmonary microvascular endothelial cells remains poorly characterized. To investigate this, we examined the effects of LPS, CytX, and PROK1 on the angiogenic behavior of HPMECs. Cells were treated with either factor and analyzed for tube-like formation, proliferation, and invasive capacity using Matrigel-based assays. Tube formation was assessed by quantifying the number of branch points per image (Fig. 9A). Compared to control conditions (~8.3 ± 1.7 branches/image), all treatments significantly decreased tube formation. The most pronounced reductions were observed with CytX (~4.9 ± 2.3) and LPS (~4.8 ± 0.9), while PROK1 produced a moderate but significant decrease (~6.3 ± 1.4). Proliferation assays revealed similar trends: both LPS and CytX markedly suppressed HPMEC proliferation, with CytX displaying the stronger inhibitory effect (Fig. 9B, C). In contrast, PROK1 did not exhibit any significant effect on the proliferation of HPMECs (Fig. 9D). Consistent with these findings, cell migration assays showed that PROK1 treatment did not alter the migratory profile of HPMECs, as assessed by scratch wound closure and transwell migration assays (Fig. S6A–C). These results suggest that, unlike other endothelial cell types, PROK1 does not stimulate proliferation or migration in the pulmonary microvascular endothelium. Previous studies have extensively described the role of PROK1 in promoting angiogenesis, particularly in endocrine tissues and tumors (40,46). Its proangiogenic effects were linked to enhanced endothelial proliferation, migration, and tube formation in several vascular beds, including placental and adrenal microvascular endothelium (8,47).

The current results suggest that PROK1, while modestly inhibiting tube formation, does not affect proliferation or migration of HPMECs. This divergence may reflect tissue or medium-specific responses or differences in receptor expression (PROKR1/2) in pulmonary microvascular endothelium compared to other vascular types. Under our experimental conditions, the culture medium used (EBM-2 supplemented with pro-angiogenic additives) contains several potent angiogenic factors, including VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), hFGF-B (basic Fibroblast Growth Factor/FGF-2), and EGF (Epidermal Growth Factor). These factors are well-documented for their strong stimulatory effects on endothelial cell proliferation and migration, and may therefore obscure the specific contribution of PROK1 to these processes. To test this hypothesis, we employed M199 medium supplemented with 20% FBS, a formulation also used in the culture of HPMECs (19).

We first compared the effects of EBM-2 and M199 on HPMEC migration, proliferation, and tube-like structure formation. Replacing EBM-2 (rich in angiogenic factors) with M199 + 20% FBS led to a significant reduction in all three angiogenic processes over time (Fig. S7A-C). We then used these conditions to assess the effects of PROK1, CytX, and LPS on HPMECs. In EBM-2, results mirrored those previously reported in Figures 9 and S7, confirming that PROK1 had minimal or no detectable impact under proangiogenic-rich medium (Fig. 10A-I). However, under M199 conditions, PROK1 significantly enhanced proliferation, migration, and tube formation (Fig. 10A, D, G), indicating a genuine angiogenic effect that was previously masked.

Interestingly, CytX elicited similar proangiogenic effects under M199 conditions, particularly on proliferation and migration, but had no significant impact on tube formation (Fig. 10B, E, H). In contrast, LPS maintained its inhibitory effects on proliferation and tube formation, with no effect on migration, consistent across both media types (Fig. 10C, F, I).

Collectively, these findings demonstrate that the presence of exogenous proangiogenic factors (e.g., VEGF, FGF-2, EGF) in standard media, may mask the true angiogenic potential of specific molecules like PROK1. When studied in a more neutral or baseline environment (M199 + 20% FBS), PROK1 exhibits clear proangiogenic effects on HPMECs, enhancing proliferation, migration, and tube formation. To further validate these findings, we assessed the invasive capacity of HPMECs on Matrigel under EBM-2 conditions, with or without PROK1. As shown in **Figure 11A** and **11B**, PROK1 significantly enhanced the invasive behavior of HPMECs, confirming its proangiogenic role in pulmonary microvascular endothelium.

Increased transmigration of HL60 cells activated by inflammation, LPS, and PROK1

The endothelial tissue plays a central role in the inflammatory response by facilitating the migration of innate immune cells, primarily neutrophils, from the bloodstream into peripheral tissues. This process, known as trans-endothelial migration or diapedesis, involves several key steps: neutrophil activation, adhesion to the endothelium, and subsequent transmigration across the endothelial barrier. While the involvement of prokineticins in this process has been reported for PROK2 (43,45), the role of PROK1, particularly within the pulmonary microvascular endothelium, has never been described. To investigate this, we used the human promyelocytic cell line HL-60, a widely accepted neutrophil-like model upon differentiation, to explore whether PROK1 modulates HL-60 adhesion and transmigration.

First, we confirmed the expression of the prokineticin receptors PROKR1 and PROKR2 in HL-60 cells via immunoblot analysis. As a reference, we used BHK cells stably transfected with either PROKR1 or PROKR2, along with HPMECs, which endogenously express both receptors.

Our results showed endogenous expression of both PROKR1 and PROKR2 in HL-60 cells (Fig. S8A, B). Notably, treatment with PROK1 or PROK2 did not alter the expression levels of these receptors in HL-60 cells (Fig. S8C, D), suggesting that any functional effect is mediated via receptor activation rather than regulation of receptor expression. We next assessed HL-60 adhesion to HPMEC monolayers using a fluorescence-based assay, with control values normalized to 1. PROK1 treatment significantly increased HL-60 adhesion to HPMECs, to a degree comparable to CytX. LPS, as expected, induced a nearly two-fold increase in adhesion (Fig. 12A), consistent with its established pro-inflammatory role. Following adhesion, we evaluated trans-endothelial migration by quantifying HL-60 cells that successfully crossed an HPMEC monolayer cultured on a polycarbonate membrane, after treatment with PROK1, CytX, or LPS. Strikingly, both PROK1 and CytX increased transmigration by approximately 100-fold, while LPS enhanced this process by over 400-fold (Fig. 12B).

These findings reveal, for the first time, that PROK1 enhances both adhesion and transmigration of myeloid cells across pulmonary microvascular endothelium, suggesting a previously unrecognized role for PROK1 in inflammation and leukocyte trafficking.

Discussion

In this study, we conducted a comprehensive characterization of the functional maturation of the HPMEC-ST1.6R cells, *in vitro,* and examined their responses to inflammatory (CytX), infectious (LPS), and cytokine (PROK1) stimuli. Our findings reveal a strong temporal dynamic in the establishment of the endothelial phenotype, a maturation-dependent sensitivity to inflammatory insult, and a novel and significant role for PROK1 in modulating pulmonary endothelial barrier integrity.

We demonstrate that HPMECs progressively acquire the features of a mature endothelium *in vitro*, evidenced by increasing trans-endothelial TEER, reduced paracellular permeability, and the capacity to form branched tubular networks (21). This functional maturation is accompanied by a time-dependent upregulation of key endothelial markers such as CD31, CD34, von Willebrand factor and VEGFR2, as well as the junctional proteins, occludin, ZO-1, VE-cadherin, and β-catenin (27,29) These results are consistent with previous reports on endothelial barrier development and junction assembly (28,30,31), but provide a more detailed temporal analyses in the HPMEC-ST1.6R model (19) .

Our data reveal that the stage of endothelial maturation critically determines the magnitude of response to inflammatory (CytX) or bacterial (LPS) challenges.

Cells cultured for 3 days, during the active phase of junctional complex formation, are more susceptible to barrier disruption and inflammatory activation, as shown by reduced TEER and elevated secretion of IL-6 and IL-8. In contrast, fully differentiated HPMECs at day 11 exhibit partial resistance to the same stimuli, emphasizing the protective role of mature endothelial junctions against external stresses (32,33,35,37).

A novel and important observation in this study is the opposing expression pattern of PROK1 receptors during endothelial maturation. PROKR1 expression increased significantly with culture time, while PROKR2 declined, suggesting a maturation-dependent switch in receptor dominance. This phenomenon, not previously described in the pulmonary endothelium, may reflect differential receptor function during development and homeostasis (39,42). Moreover, inflammatory and infectious stimuli upregulated both receptors in mature HPMECs, supporting their involvement in endothelial stress responses (13,40).

Our findings show that PROK1 significantly alters endothelial barrier function, mimicking the effects of classical pro-inflammatory stimuli. PROK1 induced a dose- and time-dependent decrease in TEER, disorganized VE-cadherin and CD31 expression, and promoted IL-6/IL-8 release (4,43,45). Interestingly, in immature cells (day 1), PROK1 transiently increased TEER before disrupting the barrier, suggesting a biphasic and context-dependent effect, possibly through differential signaling via PROKR1 and PROKR2.

Although PROK1 is widely recognized as a potent angiogenic factor in endocrine tissues and tumors (40,46) , its angiogenic activity in the pulmonary endothelium appears to be influenced by the extracellular environment. In pro-angiogenic media (EBM-2), PROK1 had minimal effects on HPMEC proliferation or migration, likely masked by the presence of VEGF, FGF-2, and EGF (8). However, under less supplemented conditions (M199 + 20% FBS), PROK1 significantly promoted endothelial proliferation, migration, invasion, and tube formation, revealing its true angiogenic potential in pulmonary microvascular cells. These results indicate that PROK1's effects may vary according to the angiogenic state of the microenvironment, with distinct responses under pro-angiogenic versus anti-angiogenic settings.

For the first time, we report that PROK1 facilitates the adhesion and transmigration of neutrophil-like HL-60 cells across HPMEC monolayers. While the effect was not as strong as that of LPS, it was comparable to CytX and clearly significant. These findings suggest a novel role for PROK1 in regulating leukocyte recruitment to the pulmonary vasculature, possibly through endothelial activation and direct action on myeloid cells expressing PROKR1/2 (43,48).

Taken together, our results identify PROK1 as a multifaceted regulator of pulmonary endothelial physiology, with effects spanning vascular permeability, cytokine release, angiogenic behavior, and immune cell transmigration. These effects are highly dependent on endothelial maturation and the extracellular context. In the setting of inflammatory pulmonary diseases such as COPD, asthma, COVID-19, and cystic fibrosis, PROK1 may serve as a therapeutic factor to mitigate endothelial dysfunction and excessive immune infiltration.

Future studies should explore the intracellular signaling pathways downstream of PROKR1 and PROKR2 in pulmonary endothelium, including MAPK, PI3K/AKT, and Rho-GTPase cascades (4,42). In parallel, validation in more physiologically relevant models such as human lung organoids or precision-cut lung slices will be critical to confirm the translational relevance of these findings.

Reference

1. Li M, Bullock CM, Knauer DJ, Ehlert FJ, Zhou QY. Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. Mol Pharmacol. avr 2001;59(4):692-8.
2. LeCouter J, Ferrara N. EG-VEGF and Bv8. a novel family of tissue-selective mediators of angiogenesis, endothelial phenotype, and function. Trends Cardiovasc Med. oct 2003;13(7):276-82.
3. Vincenzi M, Kremić A, Jouve A, Lattanzi R, Miele R, Benharouga M, et al. Therapeutic Potential of Targeting Prokineticin Receptors in Diseases. Pharmacol Rev. nov 2023;75(6):1167-99.
4. Lin DCH, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. J Biol Chem. 31 mai 2002;277(22):19276-80.
5. Masuda Y, Takatsu Y, Terao Y, Kumano S, Ishibashi Y, Suenaga M, et al. Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. Biochem Biophys Res Commun. 26 avr 2002;293(1):396-402.
6. Guilini C, Urayama K, Turkeri G, Dedeoglu DB, Kurose H, Messaddeq N, et al. Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. Am J Physiol Heart Circ Physiol. mars 2010;298(3):H844-852.
7. Podlovni H, Ovadia O, Kisliouk T, Klipper E, Zhou QY, Friedman A, et al. Differential expression of prokineticin receptors by endothelial cells derived from different vascular beds: a physiological basis for distinct endothelial function. Cell Physiol Biochem. 2006;18(6):315-26.
8. Brouillet S, Hoffmann P, Benharouga M, Salomon A, Schaal JP, Feige JJ, et al. Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential

effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. Mol Biol Cell. 15 août 2010;21(16):2832-43.

9. Kisliouk T, Podlovni H, Spanel-Borowski K, Ovadia O, Zhou QY, Meidan R. Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. Endocrinology. sept 2005;146(9):3950-8.

10. Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. Endocrinology. avr 2006;147(4):1675-84.

11. LeCouter J, Zlot C, Tejada M, Peale F, Ferrara N. Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. Proc Natl Acad Sci U S A. 30 nov 2004;101(48):16813-8.

12. Dorsch M, Qiu Y, Soler D, Frank N, Duong T, Goodearl A, et al. PK1/EG-VEGF induces monocyte differentiation and activation. J Leukoc Biol. août 2005;78(2):426-34.

13. Monnier J, Samson M. Cytokine properties of prokineticins. The FEBS Journal. 2008;275(16):4014-21.

14. Lehr S, Kotzka J, Herkner A, Sikmann A, Meyer HE, Krone W, et al. Identification of major tyrosine phosphorylation sites in the human insulin receptor substrate Gab-1 by insulin receptor kinase in vitro. Biochemistry. 5 sept 2000;39(35):10898-907.

15. Klosterhalfen B, Töns C, Hauptmann S, Tietze L, Offner FA, Küpper W, et al. Influence of heat shock protein 70 and metallothionein induction by zinc-bis-(DL-hydrogenaspartate) on the release of inflammatory mediators in a porcine model

of recurrent endotoxemia. Biochem Pharmacol. 25 oct 1996;52(8):1201-10.

16. Bouillet L, Deroux A, Benmarce M, Guérin C, Bouvet L, Garnier O, et al. Molecular Mechanisms of Endothelialitis in SARS-CoV-2 Infection: Evidence for VE-Cadherin Cleavage by ACE2. Int J Mol Sci. 7 août 2023;24(15):12525.
17. Wark PAB, Bucchieri F, Johnston SL, Gibson PG, Hamilton L, Mimica J, et al. IFN-γ–induced protein 10 is a novel biomarker of rhinovirus-induced asthma exacerbations. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 1 sept 2007;120(3):586-93.
18. Picchio V, Cammisotto V, Pagano F, Carnevale R, Chimenti I. Innovative in vitro models for the study of lung diseases. In London; 2020 [cité 30 juill 2025]. Disponible sur: https://iris.uniroma1.it/handle/11573/1472636
19. Krump-Konvalinkova V, Bittinger F, Unger RE, Peters K, Lehr HA, Kirkpatrick CJ. Generation of human pulmonary microvascular endothelial cell lines. Lab Invest. déc 2001;81(12):1717-27.
20. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. John Wiley & Sons; 2015. 758 p.
21. Lawley TJ, Kubota Y. Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. J Invest Dermatol. août 1989;93(2 Suppl):59S-61S.
22. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. Cell. 16 sept 2011;146(6):873-87.
23. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. Annu Rev Cell Biol. 1990;6:217-46.
24. Newman PJ. The biology of PECAM-1. J Clin Invest. 1 janv 1997;99(1):3-8.
25. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. Blood. 15 juin

1990;75(12):2417-26.

26. Murakami M, Iwai S, Hiratsuka S, Yamauchi M, Nakamura K, Iwakura Y, et al. Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. Blood. 15 sept 2006;108(6):1849-56.

27. Dejana E, Tournier-Lasserve E, Weinstein BM. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. Dev Cell. févr 2009;16(2):209-21.

28. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, et al. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. J Cell Biol. sept 1992;118(6):1511-22.

29. Wallez Y, Huber P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. Biochim Biophys Acta. mars 2008;1778(3):794-809.

30. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. J Lab Autom. avr 2015;20(2):107-26.

31. Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud PO, Deli MA, et al. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. J Cereb Blood Flow Metab. mai 2016;36(5):862-90.

32. Aird WC. Endothelium as an organ system. Crit Care Med. mai 2004;32(5 Suppl):S271-279.

33. Opal SM, van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. J Intern Med. mars 2015;277(3):277-93.

34. Bazzoni G. The JAM family of junctional adhesion molecules. Curr Opin Cell Biol.

oct 2003;15(5):525-30.

35. Komarova Y, Malik AB. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. Annu Rev Physiol. 2010;72:463-93.

36. Privratsky JR, Newman PJ. PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. Cell Tissue Res. mars 2014;355(3):607-19.

37. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. Nat Rev Immunol. oct 2007;7(10):803-15.

38. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation. 5 mars 2002;105(9):1135-43.

39. Negri EM, Piloto BM, Morinaga LK, Jardim CVP, Lamy SAED, Ferreira MA, et al. Heparin Therapy Improving Hypoxia in COVID-19 Patients – A Case Series. Front Physiol [Internet]. 19 oct 2020 [cité 31 juill 2025];11. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2020.573044/full

40. LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, et al. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. Nature. août 2001;412(6850):877-84.

41. Chauvet S, Traboulsi W, Thevenon L, Kouadri A, Feige JJ, Camara B, et al. EG-VEGF, BV8, and their receptor expression in human bronchi and their modification in cystic fibrosis: Impact of CFTR mutation (delF508). Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 1 août 2015;309(3):L314-322.

42. Martucci C, Franchi S, Giannini E, Tian H, Melchiorri P, Negri L, et al. Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, induces a proinflammatory phenotype of mouse macrophages. Br J Pharmacol. janv 2006;147(2):225-34.

43. Monnier J, Samson M. Prokineticins in angiogenesis and cancer. Cancer Letters.

28 oct 2010;296(2):144-9.

44. Negri L, Lattanzi R, Giannini E, Melchiorri P. Bv8/Prokineticin proteins and their receptors. Life Sci. 15 sept 2007;81(14):1103-16.

45. Sasaki S, Baba T, Muranaka H, Tanabe Y, Takahashi C, Matsugo S, et al. Involvement of Prokineticin 2-expressing Neutrophil Infiltration in 5-Fluorouracil-induced Aggravation of Breast Cancer Metastasis to Lung. Mol Cancer Ther. juill 2018;17(7):1515-25.

46. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med. juin 2003;9(6):669-76.

47. Keramidas M, Faudot C, Cibiel A, Feige JJ, Thomas M. Mitogenic functions of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bombina variegata 8 on steroidogenic adrenocortical cells. J Endocrinol. mars 2008;196(3):473-82.

48. Lattanzi R, Severini C, Miele R. Prokineticin 2 in cancer-related inflammation. Cancer Letters. 10 oct 2022;546:215838.

Figure legends

Figure 1. Barrier maturation and structural organization of human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMEC).

(A) Depicts trans-endothelial electrical resistance (TEER) and paracellular permeability of HPMEC. Permeability FITC-dextran (FD-40) 70 kDa was measured every two days in HPMEC monolayers cultured over 25 days. TEER values ($\Omega \cdot cm^2$) were normalized to cell-free inserts and indicate progressive strengthening of barrier integrity with culture time. FITC–dextran flux was measured after a 20-minute of incubation at 37 °C. The resulting diffusive permeability was inversely correlated with TEER. Data represent mean ± SEM from three independent experiments. **(B)** Shows representative phase-contrast images of HPMECs cultured on Matrigel-coated wells. Images were captured at the time of seeding (0 h) and after 5 h of incubation. Cells were seeded at 4×10^4 per well and imaged using the CellCyteX live-cell imaging system. **(C)** Quantification of tube-like structures formed by HPMECs after 5 h of Matrigel culture. The number of branch points per field was counted in multiple images/fields per condition. Data are presented as mean ± SEM of three independent experiments.

Figure 2. Temporal characterization of endothelial markers in HPMECs throughout *In vitro* Culture.

(A–D) Western blot analyses of endothelial markers in HPMECs cultured for 1, 3, and 11 days. (**A)** shows vWF expression; (**B)** shows CD31 expression; (**C)** shows CD34 expression, and **(D)** shows VEGFR2 expression. All proteins were detected in total HPMEC protein lysates (40 µg). β-actin was used as a loading control.

(E–H) Relative expression of vWF, CD31, CD34, and VEGFR2 mRNA levels using RT-qPCR at days 1, 3, and 11 of culture. Expression levels were normalized to GAPDH. Data are presented as mean ± SEM of three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *$P \leq 0.05$, **$P \leq 0.01$.

Figure 3. Temporal characterization of junctional proteins expression in HPMECs throughout *In vitro* Culture.

Western blot analyses of junctional proteins markers in HPMECs cultured for 1, 3, and 11 days. (**A)** shows VE-cadherin; (**B)** shows β-catenin; (**C)** shows ZO-1, and **(D)** shows occludin expression. All proteins were detected in total HPMEC protein lysates (40 µg). β-actin was used as a loading control. **(E–H)** Quantitative RT-PCR analysis of VE-cadherin, β-catenin, ZO-1,

and occludin transcripts in HPMECs at days 1, 3, and 11. Transcript levels were normalized to GAPDH expression. Values represent mean ± SEM from three replicates. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01

Figure 4. Differential effects of LPS and Cytomix on endothelial barrier function depend on the maturation state of HPMECs.

(A–C) Transendothelial electrical resistance (TEER) measurements in HPMEC monolayers cultured for 1 day (**A**), 3 days (**B**), or 11 days (**C**), followed by treatment with either LPS (100 ng/mL) or Cytomix (10 ng/mL-TNF-α, IL-1β, and IFN-γ) for 5 days. TEER was measured daily and normalized to untreated inserts. **(D)** Depicts quantification of TEER variation for all conditions tested and throughout culture time (% of untreated control). The reported values correspond to TEER at 5 days following treatment. Data represent mean ± SEM from three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001.

Figure 5. Inflammatory stimuli downregulate endothelial junctional proteins expression in mature HPMEC monolayers.

(A-D) Western blot analysis of occludin and VE-cadherin expression after treatment with LPS (100 ng/mL) (**A, B**) or Cytomix (10 ng/mL-TNF-α, IL-1β, and IFN-γ) (**C, D)**, respectively. All conditions were tested on HPMECs cultured for 11 days and treated for 72 hours. β-actin was used as a loading control. Densitometric quantification was performed using ImageJ and normalized to β-actin. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *P ≤ 0.05

Densitometric quantification.

Figure 6. Temporal regulation of IL-6 and IL-8 secretion by HPMECs in response to LPS and Cytomix.

Quantification of IL-6 (**A, C**) and IL-8 **(B, D)** secretion in HPMEC cells conditioned media exposed to LPS (**A, B**) or Cytomix (**C, D**). Cells were treated at day 1 (white bars), day 3 (grey bars), or day 11 (black bars) of culture, and supernatants collected at indicated time. Cytokine levels were normalized to total protein content and expressed as pg/mg of protein. Data represent mean ± SEM of three independent experiments.

Figure 7. Inflammatory stimuli modulate the expression of prokineticin receptors PROKR1 and PROKR2 in HPMECs.

Western blot analysis of PROKR1 (**A, B**) and PROKR2 (**C, D**) expression in HPMECs cultured for 11 days and treated for the indicated time with Cytomix (**A, C**) or LPS (**B, D**). Total protein lysates (40 μg) were analyzed using specific antibodies. β-actin served as the internal loading control. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *P ≤ 0.05

Figure 8. PROK1 impairs endothelial barrier integrity and induces inflammatory cytokine production in HPMECs.

(A-C) Transendothelial electrical resistance (TEER) measurements in HPMECs treated with 25 nM PROK1 for the indicated time, starting at day 1 (**A**), days 3 (**B**), or days 11 (**C**) of culture. TEER values are expressed as Ω·cm² and normalized to untreated cell-free inserts.

(D, E) depicts IL-6 and IL-8 secretion levels in culture supernatants upon PROK1 treatment following 1, 3 and 11 days of culture. PROK1 was measured by ELISA and normalized to total protein. **(F-G)** shows western blot analysis of PROKR1 and PROKR2 expression in HPMECs cultured for 11 days and treated with PROK1 for the indicated time. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *P ≤ 0.05.

Figure 9. Effects of LPS, Cytomix, and PROK1 on HPMEC tube like organization and proliferation.

(A) Quantification of the number of branch points formed by HPMECs after 5 hours of culture on Matrigel, in the absence or presence of LPS (100 ng/mL), Cytomix (10 ng/mL of TNF-α, IL-1β, and IFN-γ), or PROK1 (25 nM). Tube-like structures were imaged using the CellCyteX platform and branching points were manually counted. Untreated cells served as controls. Data represent mean ± SEM from three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *P ≤ 0.05. ns= non-significant. **(B–D)** Relative proliferation of HPMECs over time, monitored using the CellCyteX imaging system, following treatment with LPS (**B**), Cytomix (**C**), or PROK1 (**D**). Proliferation kinetics were normalized to untreated controls.

Figure 10. Medium-dependent effects of LPS, Cytomix, and PROK1 on HPMEC migration, proliferation, and tube-like formation.

(A–C) Time-course analysis of HPMEC migration in response to LPS (**A**), Cytomix (**B**), or PROK1 (**C**), assessed using wound healing assays monitored by the CellCyteX live-imaging system. Cells were cultured either in EBM-2 medium (represented by circles) or in M199 + 20% FBS medium (represented by squares). Wound closure was tracked over time and

compared to untreated controls. **(D–F)** Proliferation kinetics of HPMECs treated with LPS (**D**), Cytomix (**E**), or PROK1 (**F**), in EBM-2 (circles) or M199 (squares) medium, measured using CellCyteX. Cytomix and PROK1 increased proliferation in M199 medium. **(G–I)** Quantification of the number of branching points formed by HPMECs cultured on Matrigel for 5 hours under LPS (**G**), Cytomix (**H**), or PROK1 (**I**) treatment, in either EBM-2 or M199 medium. While all treatments reduced network formation in EBM-2, PROK1 significantly increased pseudovascular morphogenesis in M199, highlighting a context-dependent angiogenic effect. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *P ≤ 0.05.

Figure 11. Effect of PROK1 enhances the invasive capacity of HPMECs.

(A) Representative immunofluorescence images of HPMECs cultured on Matrigel for 5 hours under different treatment conditions. Nuclei were stained with Hoechst (blue). Cells were treated with 25 ng/mL PROK1 applied either at the apical or basal side of the culture insert. Images were acquired using the CellCyteX system. Scale bar: 20µm. **(B)** Quantification of HPMEC invasion in response to apical or basal PROK1 stimulation. Invasion was assessed by measuring the total number of cells that penetrated through the Matrigel matrix and was expressed in arbitrary units. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *P ≤ 0.05.

Figure 12. LPS, Cytomix, and PROK1 promote HL-60 adhesion and transmigration across an HPMEC monolayer.

(A) Quantification of HL-60 cell adhesion to HPMEC monolayers following stimulation with LPS (100 ng/mL), Cytomix (10 ng/mL TNF-α, IL-1β, and IFN-γ), PROK1 (25 nM), or activation mix (vitamin D3 + indomethacin). HL-60 cells were labeled with Calcein AM and incubated for 35 minutes on HPMECs cultured for 11 days. Fluorescence of lysed adherent cells was measured and expressed as fold increase relative to untreated controls. **(B)** Quantification of HL-60 trans-endothelial migration through a confluent HPMEC monolayer. HPMECs were treated for 72 hours with LPS, Cytomix, or PROK1 prior to the assay. Differentiated HL-60 cells were seeded on the upper chamber, and IL-8 (100 nM) was added to the lower chamber to generate a chemotactic gradient.

After 1 hour, migrated cells were collected and counted using an automated cell counter. Results are expressed as mean ± SEM of fold change relative to untreated condition from three independent experiments performed in duplicate. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *P ≤ 0.05;

Supplementary Data:

Figure S1. Evolution of cell density and junctional protein localization in HPMECs over time.

(A) Quantification of total cell number in P10 flasks at days 1, 3, and 11 of culture. Cell counts confirm a significant proliferative increase between days 3 and 11. Statistical analysis was performed using student-test. *P ≤ 0.05. **(B)** Representative immunofluorescence images of HPMECs cultured for 1, 3, and 11 days, stained for tight junction proteins (Occludin and ZO-1), adherens junction proteins (VE-cadherin and β-catenin), and the endothelial marker CD31 (green). Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). A progressive enrichment and organization of junctional markers at cell–cell contacts are observed over time, reflecting the maturation of the endothelial barrier. Scale bar: 10 µm.

Figure S2. Impact of inflammatory stimuli on HPMEC viability and junctional organization.

(A) Assessment of cytotoxicity in HPMECs treated for 72 hours with LPS or Cytomix, as determined by a cell viability assay. **(B)** Representative immunofluorescence images of VE-cadherin and CD31 expression (green) in HPMECs cultured for 11 days and treated with LPS or Cytomix for 72 hours. Nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bar: 10 µm.

Figure S3. Temporal expression and localization of PROKR1 and PROKR2 in HPMECs.

(A, B) Western blot analysis of PROKR1 (**A**) and PROKR2 (**B**) in HPMEC lysates (40 µg) collected at days 1, 3, and 11 of culture. β-actin was used as loading control. PROKR1 expression increased over time, while PROKR2 expression decreased, indicating reciprocal regulation during endothelial maturation. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *P ≤ 0.05. **(C)** Immunofluorescence staining for PROKR1 and PROKR2 (green) in HPMECs cultured for 1, 3, and 11 days. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). Scale bar: 10 µm.

Figure S4. Expression and secretion of PROK1 under basal and LPS/Cytomix stimulated conditions in HPMECs.

(A) Quantification of PROK1 mRNA expression in HPMECs cultured for 1, 3, and 11 days under basal (untreated) conditions, as assessed by RT-qPCR. Data were normalized to GAPDH expression. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. **P ≤ 0.01. **(B)** ELISA-based quantification of secreted PROK1 protein in the conditioned media of HPMECs at days

1, 3, and 11. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001. **(C, D)** Measurement of PROK1 secretion following treatment with LPS (C) or Cytomix (D) at days 1, 3, and 11 of culture. PROK1 levels were determined by sandwich ELISA and normalized to total protein content.

Figure S5. PROK1 treatment modulates HPMEC viability, barrier function, and junctional protein expression.

(A) Assessment of cell viability in HPMECs treated with PROK1 (25 nM) for 72 hours. No significant cytotoxicity was detected relative to untreated controls, confirming that PROK1 does not impair cell survival under the conditions used. **(B)** Relative variation in TEER values (% of untreated control) following PROK1 treatment, initiated at 24 hours, 3 days, or 11 days of culture and maintained for 5 days. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *P ≤ 0.05.

(C) Immunofluorescence staining of VE-cadherin and CD31 (green) in HPMECs cultured for 11 days and treated with PROK1 for 72 hours. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue).

Figure S6. Effect of LPS, Cytomix, and PROK1 on HPMEC migration.

(A–C) Wound healing assays were performed on HPMEC monolayers cultured in EBM-2 medium and treated with LPS (**A**), Cytomix (**B**), or PROK1 (**C**). Migration was monitored using the CellCyteX imaging system, and wound closure was quantified over time.

Figure S7. Impact of culture medium on HPMEC angiogenic functions.

(A) HPMEC migration was assessed using wound healing assays in EBM-2 versus M199 + 20% FBS media. **(B)** Cell proliferation in EBM-2 versus M199 was monitored over time using CellCyteX imaging. **(C)** Quantification of branching points after 5 hours of culture on Matrigel in both media. Cells in M199 formed fewer pseudo-tubes than in EBM-2, further supporting the suppressive effect of M199 on angiogenic behavior. Statistical analysis was performed using student-test. **P ≤ 0.01.

Figure S8. Expression of prokineticin receptors in HL-60 cells and effect of ligands, PROK1 and PROK2.

(A–B) Western blot analysis of PROKR1 (**A**) and PROKR2 (**B**) in HL-60 cells, BHK cells stably transfected with PROKR1 (BHK-R1) or PROKR2 (BHK-R2), and HPMECs. **(C–D)** HL-

60 cells were treated for 72 hours with PROK1, PROK2, or the activation mix (vitamin D3 + indomethacin). (**C**) Western blot analysis showed the expression profile of PROKR1 following PROK1 or PROK2 treatment. (D) Quantification of PROKR1 expression in HL60 following treatment with PROK1 or PROK2. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *$P \leq 0.05$.

Figure 1

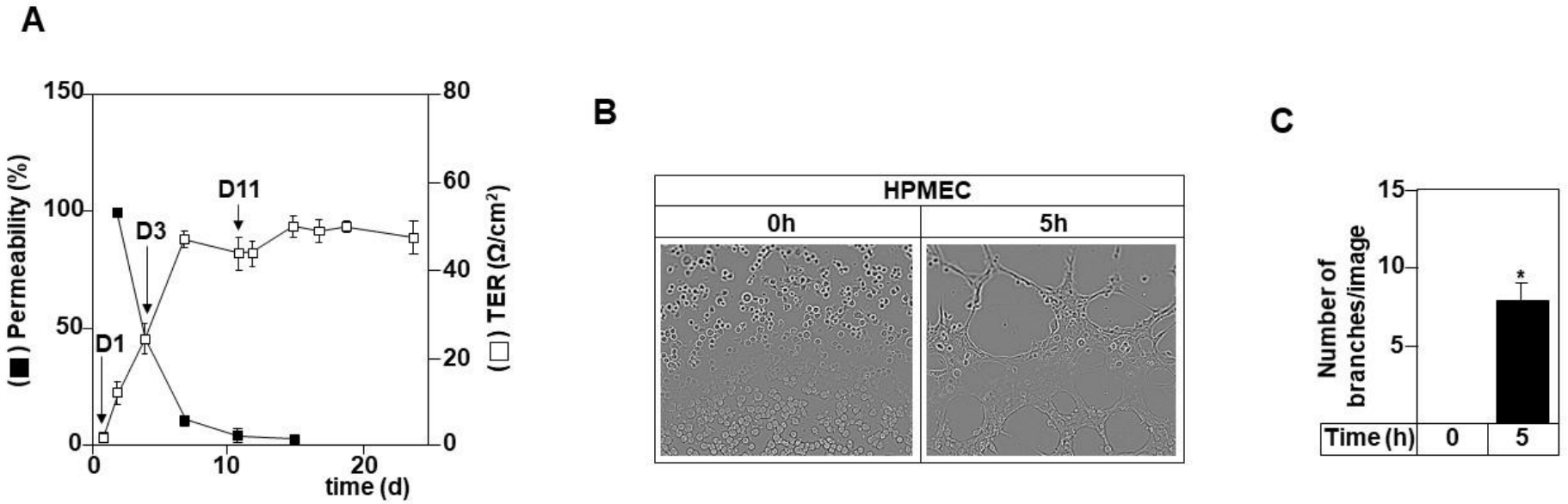

A
150
100
50
0
80
60
40
20
0
(■) Permeability (%)
(□) TER (Ω/cm²)
D1
D3
D11
0
10
20
time (d)
B
HPMEC
0h
5h
C
Number of branches/image
15
10
5
*
Time (h)
0
5

Figure 2

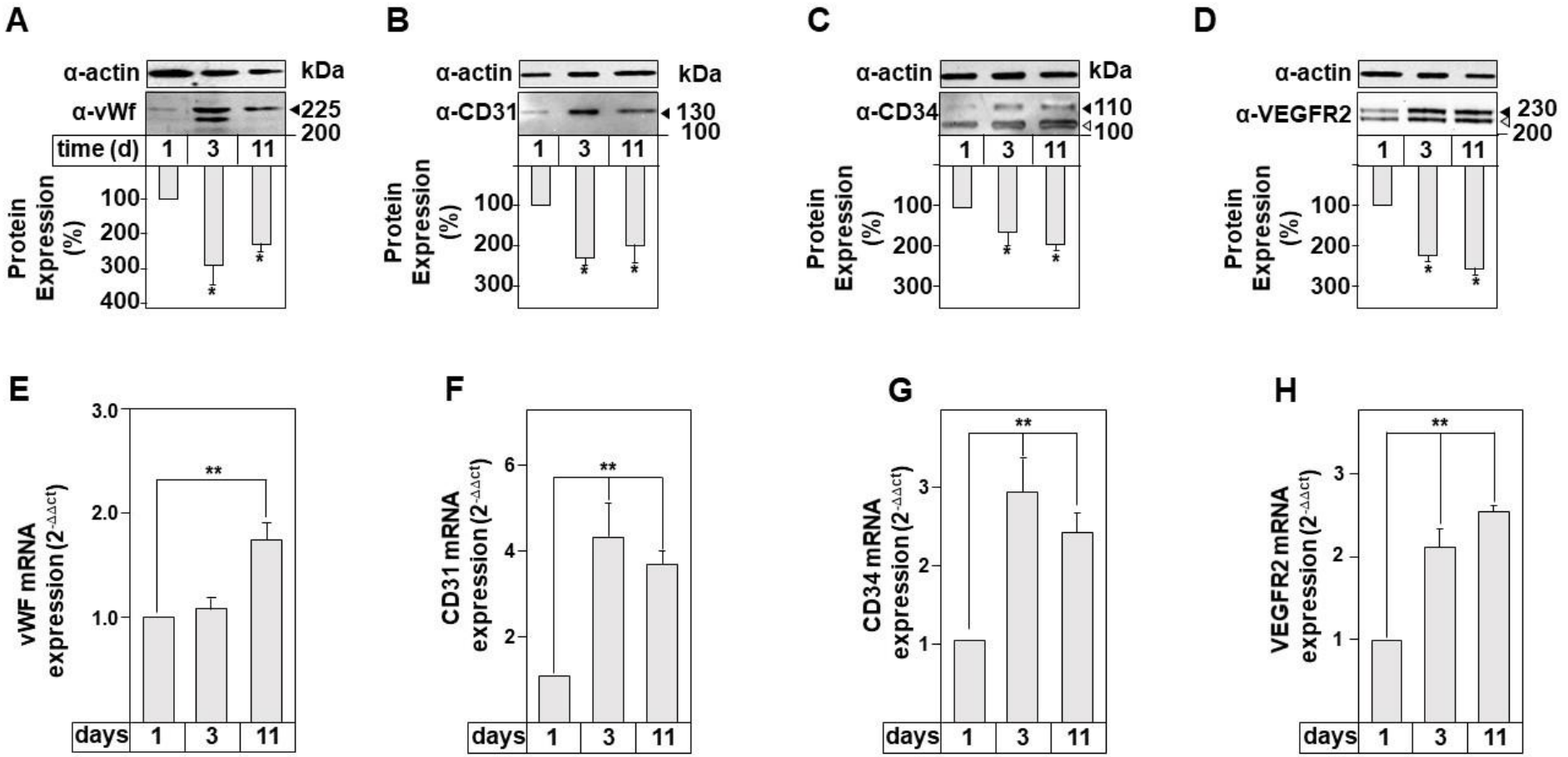

A
α-actin
kDa
α-vWf
225
200
time (d)
1
3
11
Protein Expression (%)
100
200
300
400
B
α-actin
kDa
α-CD31
130
100
1
3
11
Protein Expression (%)
100
200
300
C
α-actin
kDa
α-CD34
110
100
1
3
11
Protein Expression (%)
100
200
300
D
α-actin
α-VEGFR2
230
200
1
3
11
Protein Expression (%)
100
200
300
E
vWF mRNA expression (2-ΔΔct)
3.0
2.0
1.0
**
days
1
3
11
F
CD31 mRNA expression (2-ΔΔct)
6
4
2
**
days
1
3
11
G
CD34 mRNA expression (2-ΔΔct)
3
2
1
**
days
1
3
11
H
VEGFR2 mRNA expression (2-ΔΔct)
3
2
1
**
days
1
3
11

Figure 3

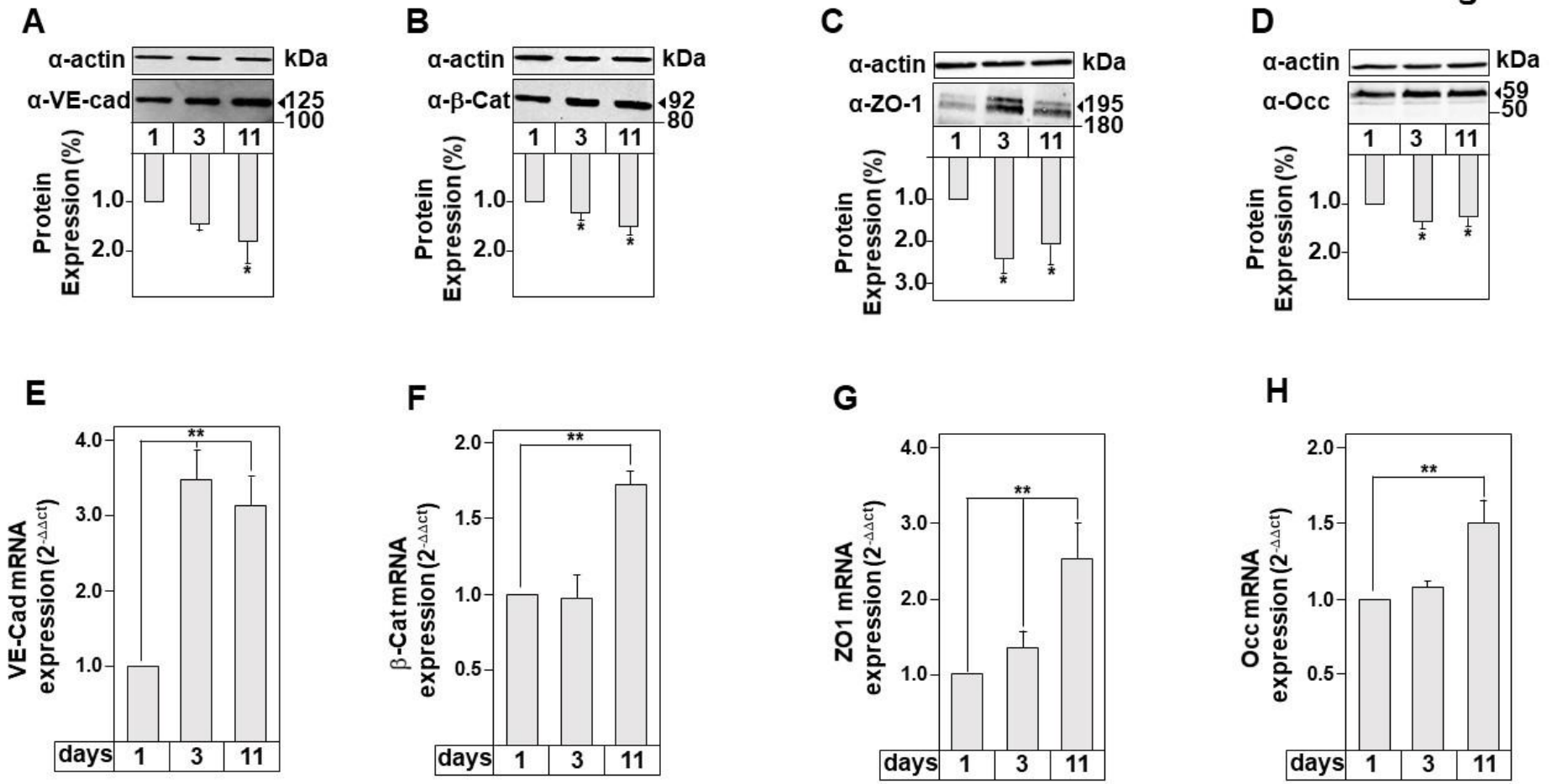

A
α-actin
kDa
α-VE-cad
125
100
1
3
11
Protein Expression (%)
1.0
2.0
B
α-actin
kDa
α-β-Cat
92
80
1
3
11
Protein Expression (%)
1.0
2.0
C
α-actin
kDa
α-ZO-1
195
180
1
3
11
Protein Expression (%)
1.0
2.0
3.0
D
α-actin
kDa
α-Occ
59
50
1
3
11
Protein Expression (%)
1.0
2.0
E
VE-Cad mRNA expression (2-ΔΔct)
4.0
3.0
2.0
1.0
**
days
1
3
11
F
β-Cat mRNA expression (2-ΔΔct)
2.0
1.5
1.0
0.5
**
days
1
3
11
G
ZO1 mRNA expression (2-ΔΔct)
4.0
3.0
2.0
1.0
**
days
1
3
11
H
Occ mRNA expression (2-ΔΔct)
2.0
1.5
1.0
0.5
**
days
1
3
11

Figure 4

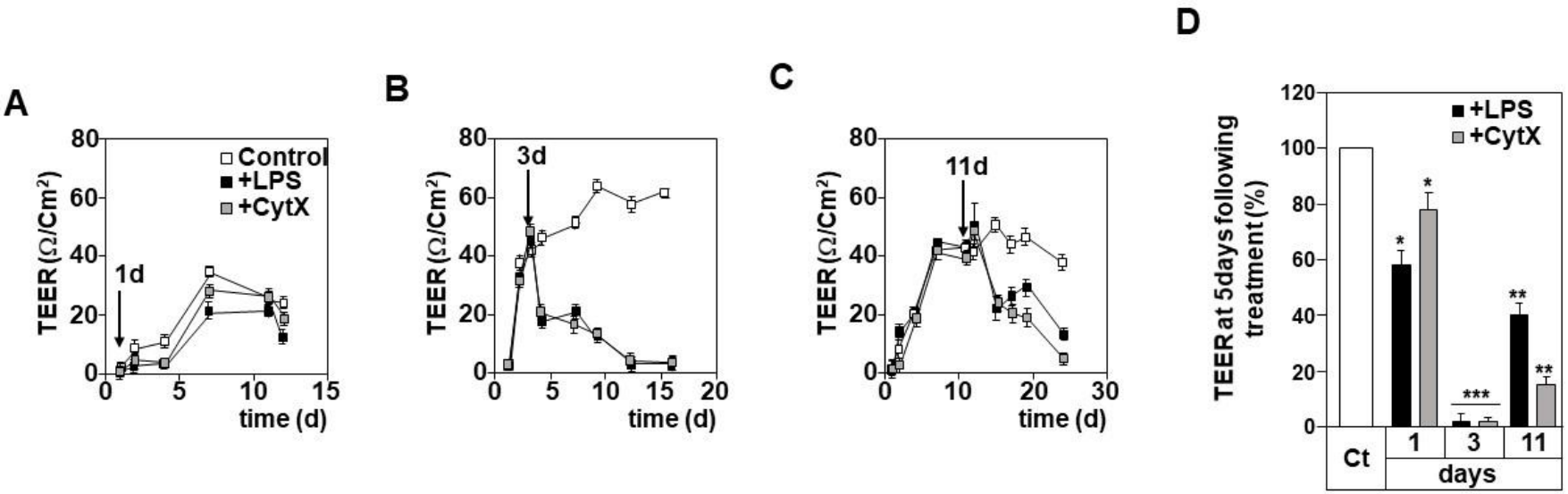

A
B
C
D
TEER (Ω/Cm²)
time (d)
Control
+LPS
+CytX
1d
3d
11d
TEER at 5days following treatment (%)
Ct
1
3
11
days
*
**
***

Figure 5

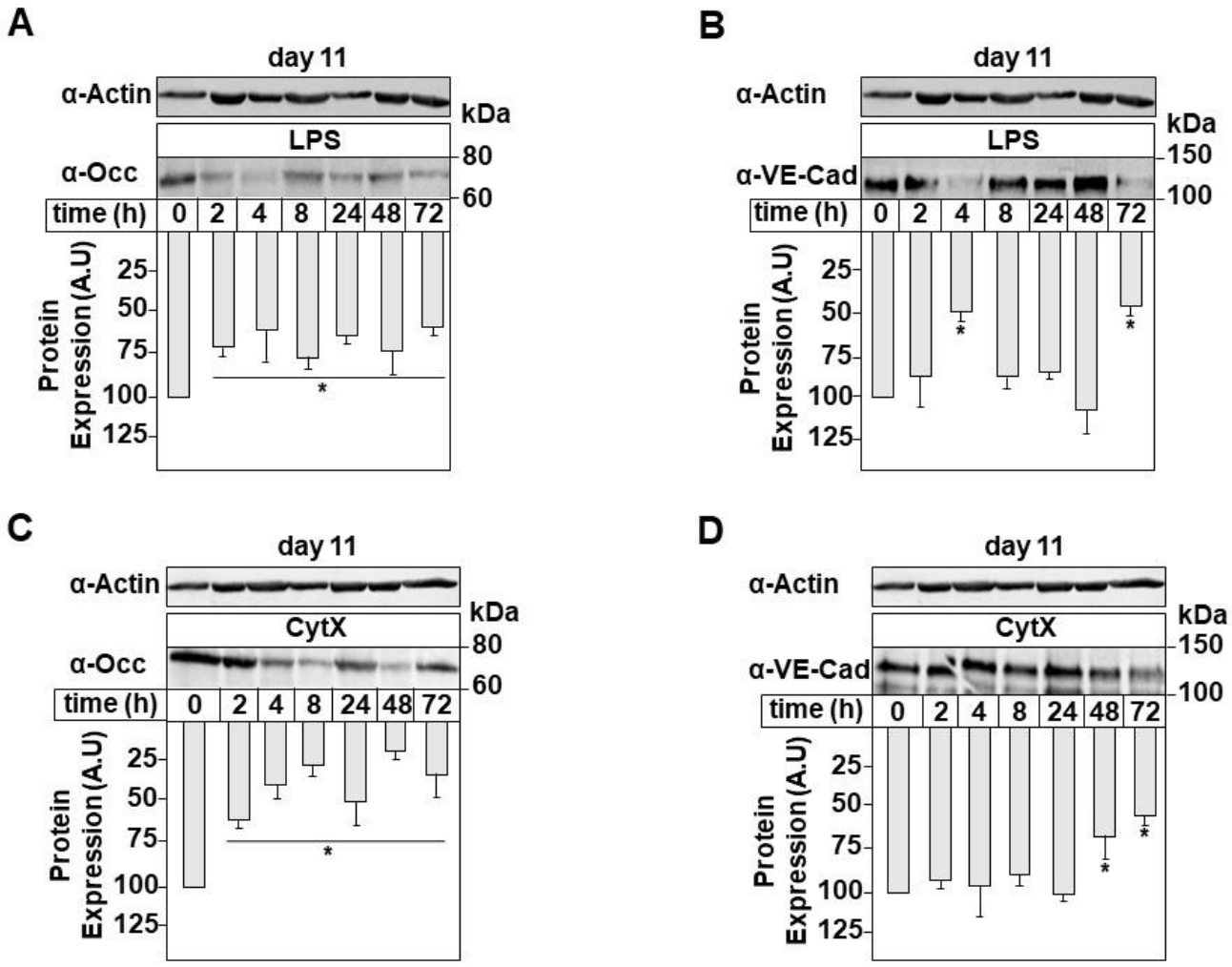

A
day 11
α-Actin
kDa
LPS
α-Occ
80
60
time (h)
0
2
4
8
24
48
72
Protein Expression (A.U)
25
50
75
100
125
*
B
day 11
α-Actin
kDa
LPS
α-VE-Cad
150
100
time (h)
0
2
4
8
24
48
72
Protein Expression (A.U)
25
50
75
100
125
*
*
C
day 11
α-Actin
kDa
CytX
α-Occ
80
60
time (h)
0
2
4
8
24
48
72
Protein Expression (A.U)
25
50
75
100
125
*
D
day 11
α-Actin
kDa
CytX
α-VE-Cad
150
100
time (h)
0
2
4
8
24
48
72
Protein Expression (A.U)
25
50
75
100
125
*
*

Figure 6

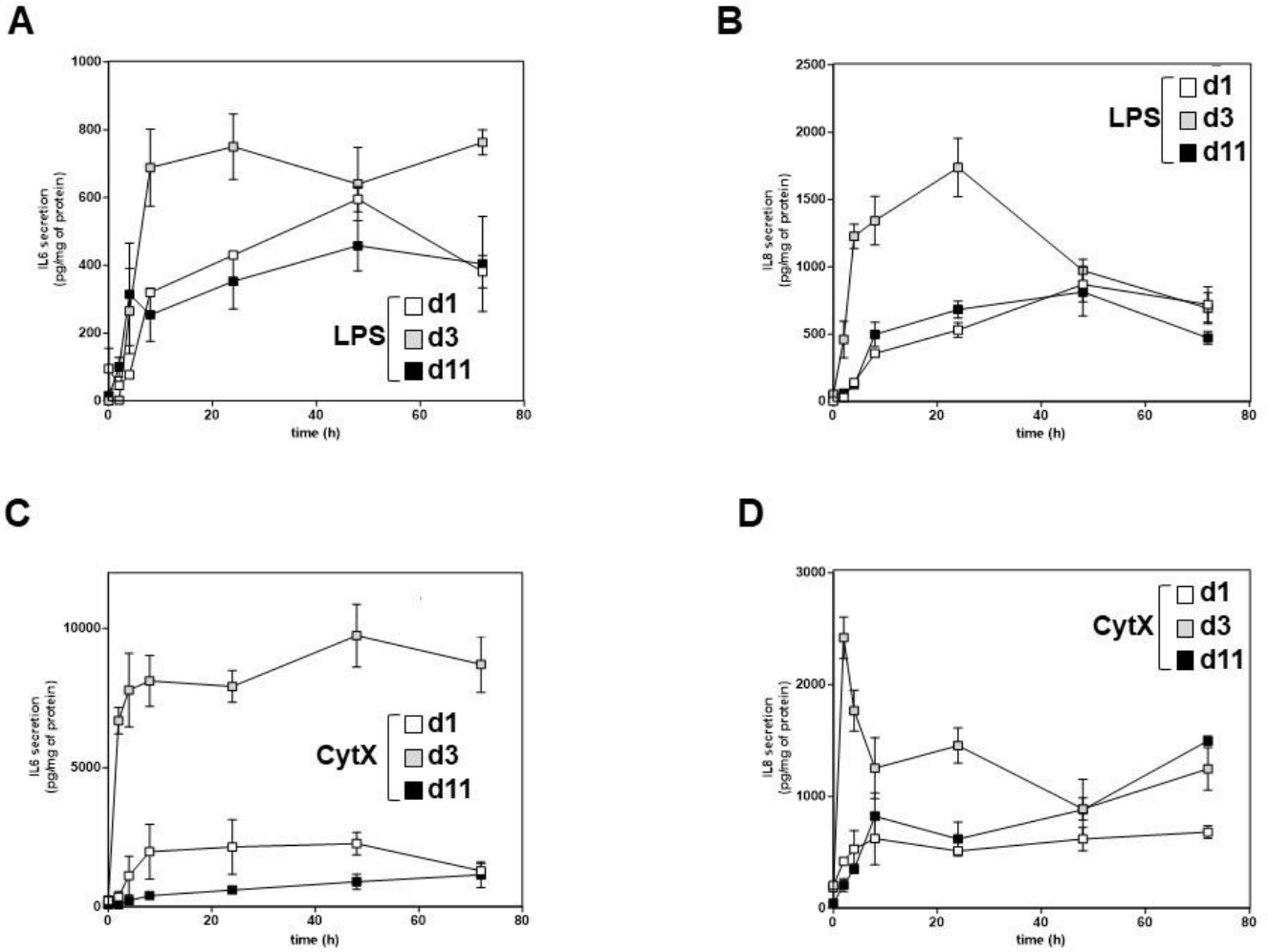

A
B
C
D
IL6 secretion (pg/mg of protein)
IL8 secretion (pg/mg of protein)
time (h)
LPS
CytX
d1
d3
d11

Figure 7

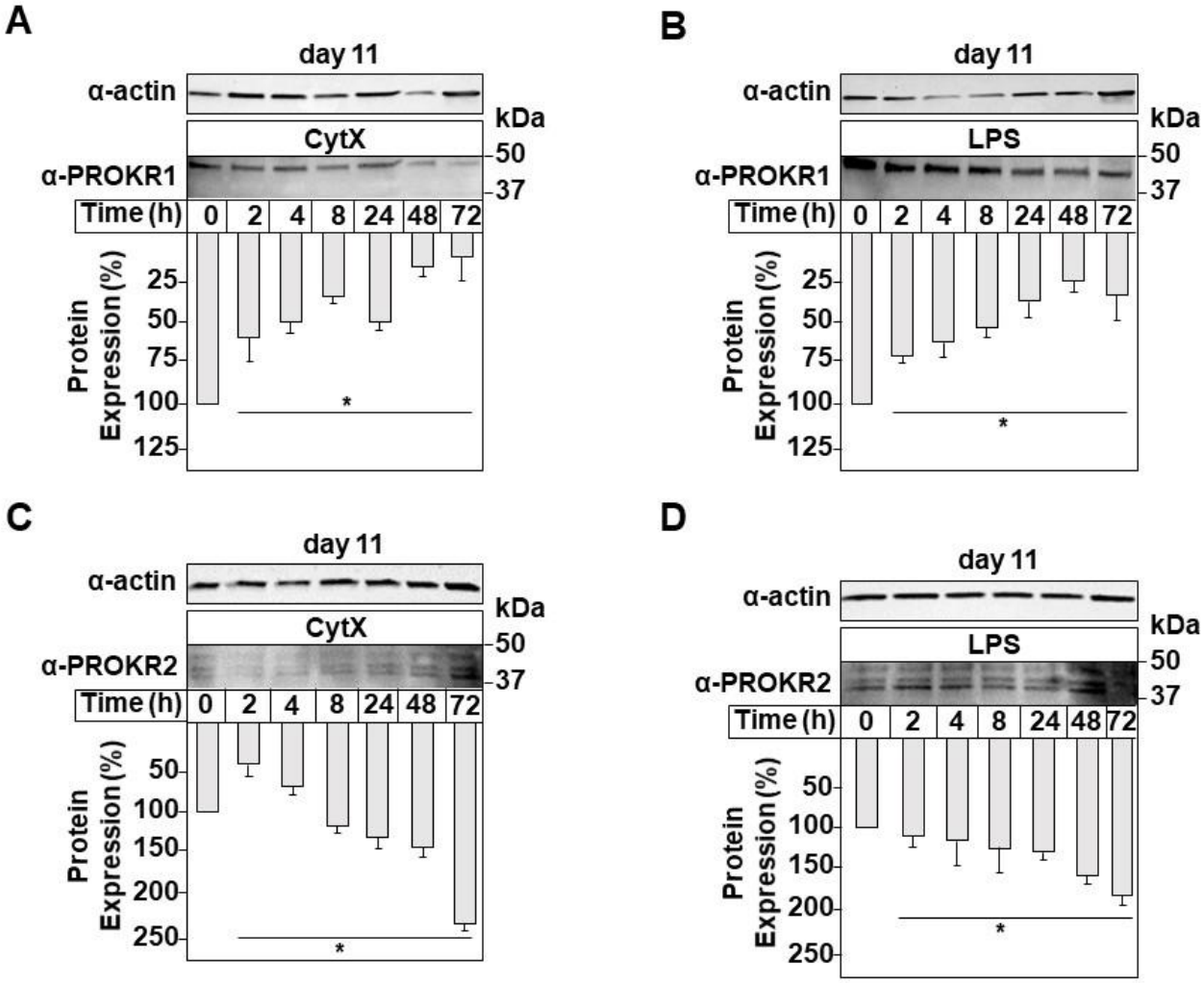

A
day 11
α-actin
kDa
CytX
α-PROKR1
50
37
Time (h) 0 2 4 8 24 48 72
Protein Expression (%)
25
50
75
100
125
*
B
day 11
α-actin
kDa
LPS
α-PROKR1
50
37
Time (h) 0 2 4 8 24 48 72
Protein Expression (%)
25
50
75
100
125
*
C
day 11
α-actin
kDa
CytX
α-PROKR2
50
37
Time (h) 0 2 4 8 24 48 72
Protein Expression (%)
50
100
150
200
250
*
D
day 11
α-actin
kDa
LPS
α-PROKR2
50
37
Time (h) 0 2 4 8 24 48 72
Protein Expression (%)
50
100
150
200
250
*

Figure 8

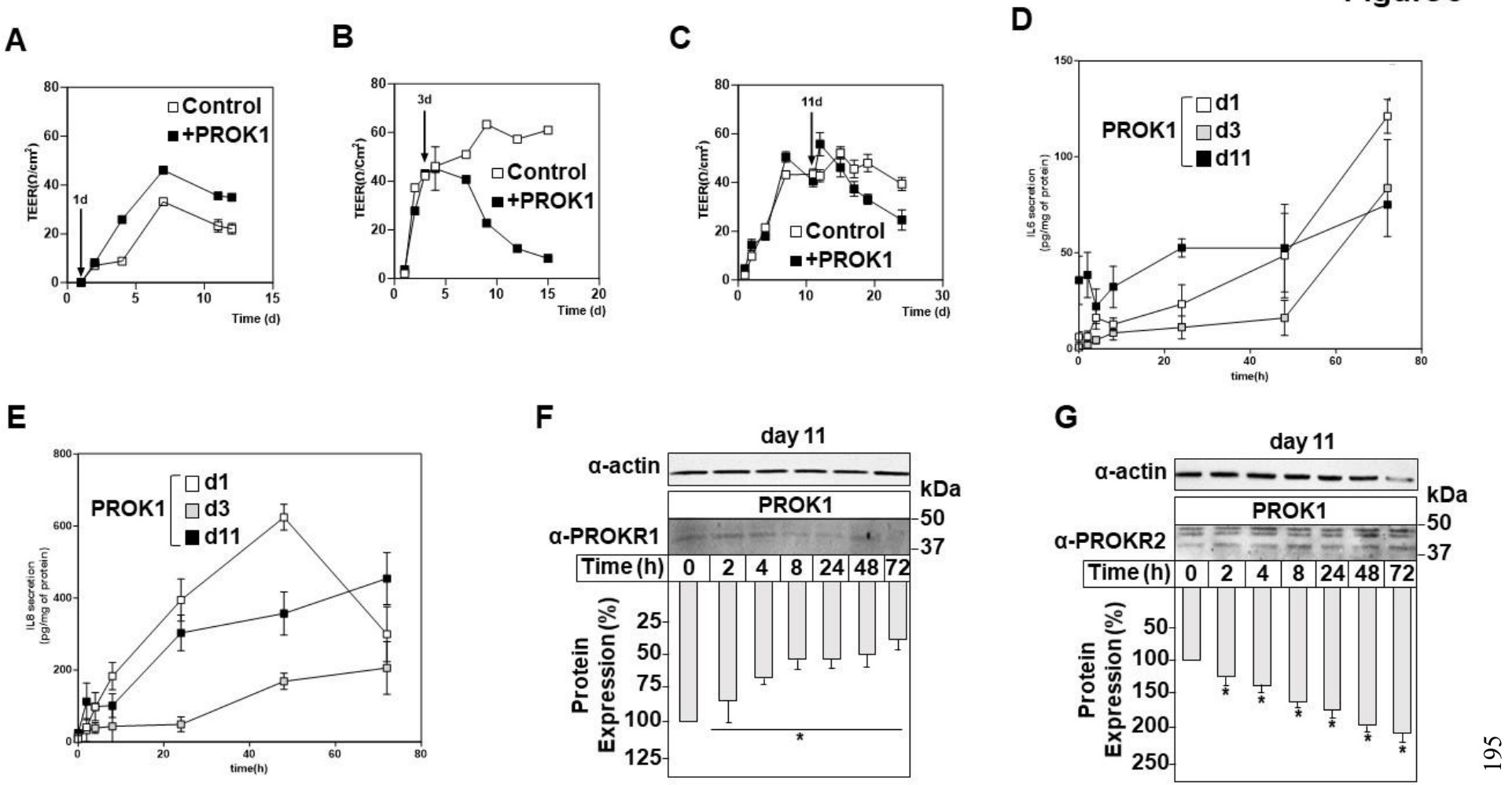

A
B
C
D
E
F
G
Control
+PROK1
1d
3d
11d
TEER(Ω/cm²)
Time (d)
PROK1
d1
d3
d11
IL6 secretion (pg/mg of protein)
IL8 secretion (pg/mg of protein)
time(h)
day 11
α-actin
α-PROKR1
α-PROKR2
kDa
50
37
Time (h)
0
2
4
8
24
48
72
Protein Expression (%)
*

Figure 9

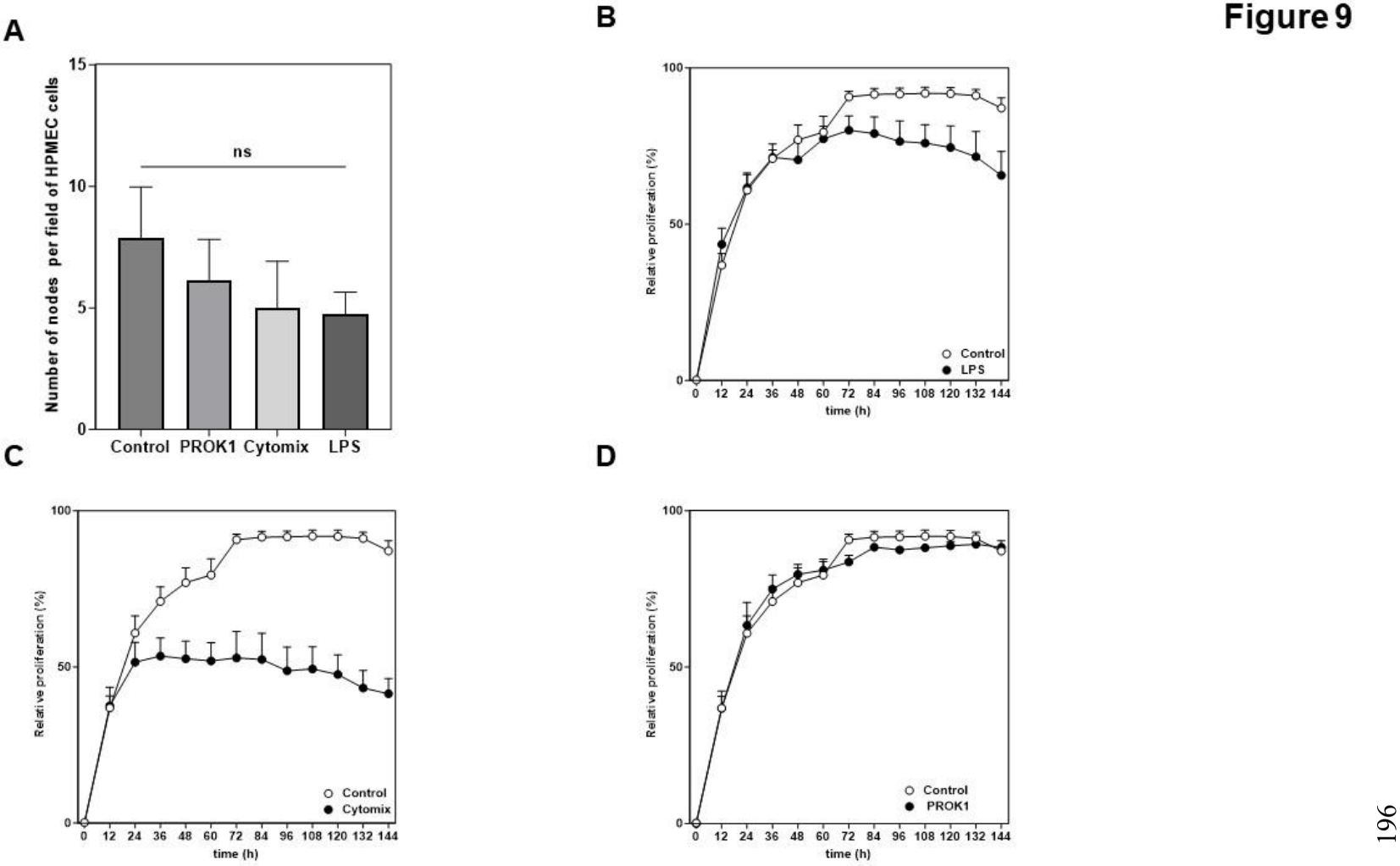

A
Number of nodes per field of HPMEC cells
15
10
5
0
ns
Control
PROK1
Cytomix
LPS
B
Relative proliferation (%)
100
50
0
Control
LPS
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120 132 144
time (h)
C
Relative proliferation (%)
100
50
0
Control
Cytomix
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120 132 144
time (h)
D
Relative proliferation (%)
100
50
0
Control
PROK1
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120 132 144
time (h)

Figure 10

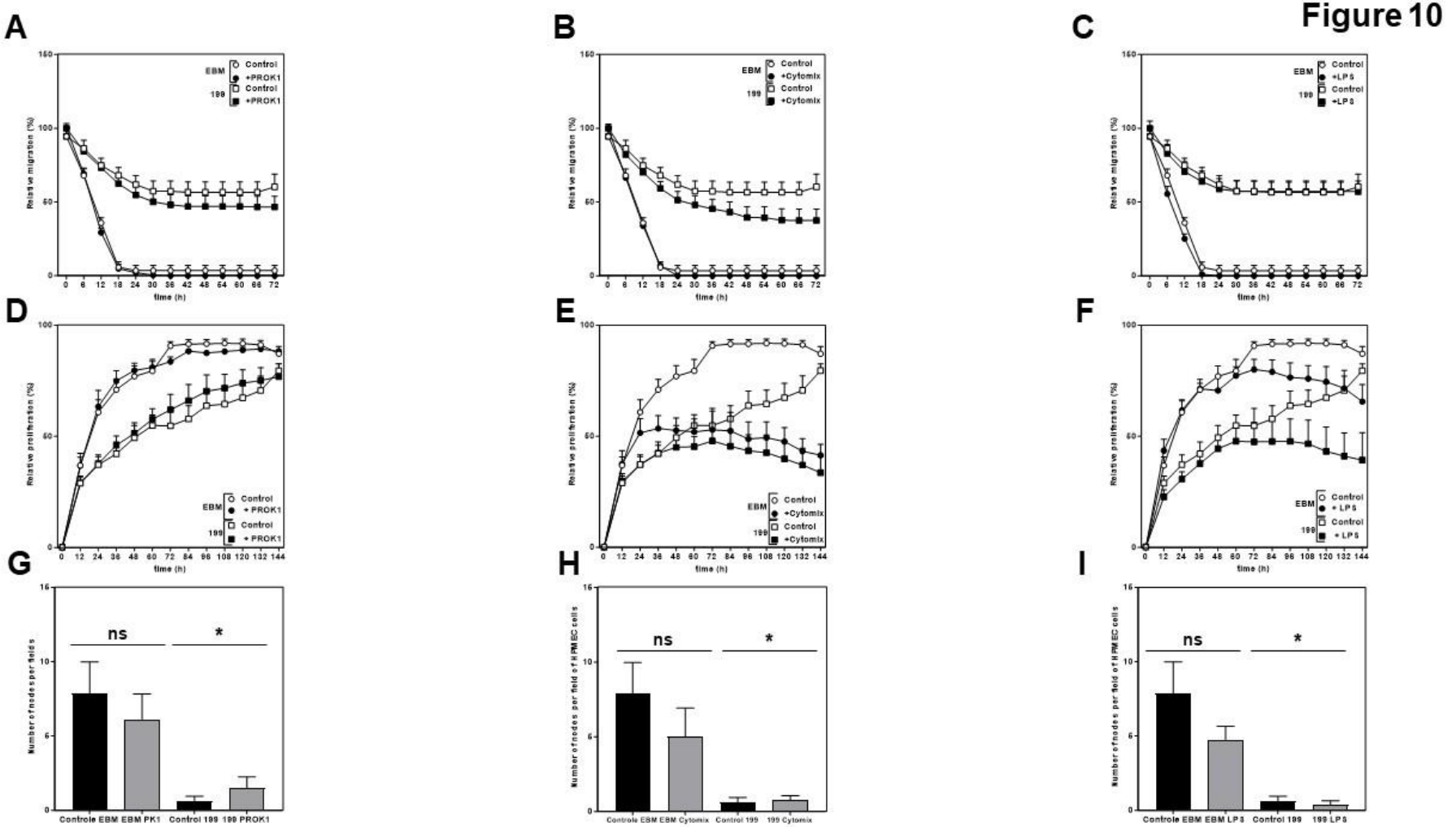
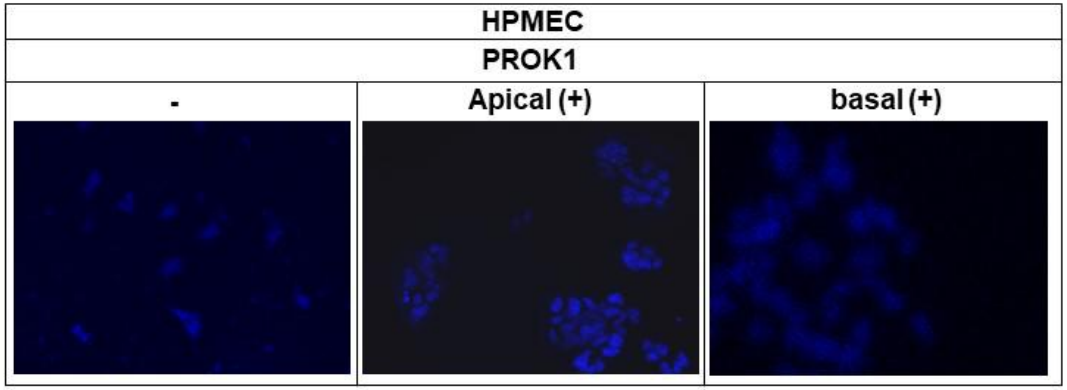

A
B
C
D
E
F
G
H
I
EBM
199
Control
+PROK1
+Cytomix
+LPS
Relative migration (%)
Relative proliferation (%)
time (h)
Number of nodes per field
ns
*
Controle EBM EBM PK1 Control 199 199 PROK1
Controle EBM EBM Cytomix Control 199 199 Cytomix
Controle EBM EBM LPS Control 199 199 LPS

Figure 11

A


HPMEC
PROK1
-
Apical (+)
basal (+)

B

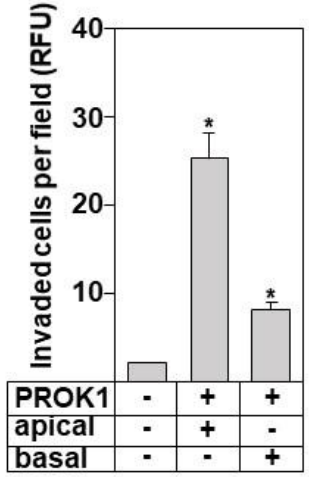
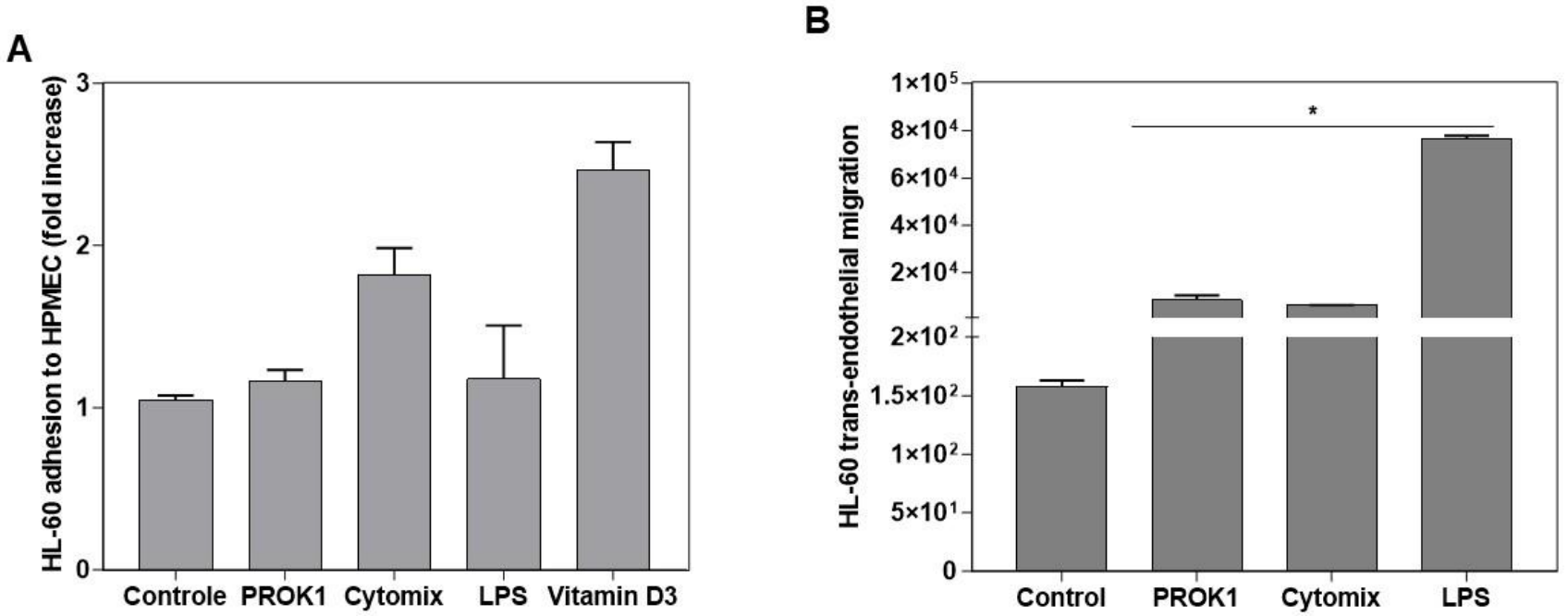

Invaded cells per field (RFU)
40
30
20
10
*
*
PROK1 - + +
apical - + -
basal - - +

Figure 12


A
HL-60 adhesion to HPMEC (fold increase)
0
1
2
3
Controle
PROK1
Cytomix
LPS
Vitamin D3
B
HL-60 trans-endothelial migration
0
5×10¹
1×10²
1.5×10²
2×10²
2×10⁴
4×10⁴
6×10⁴
8×10⁴
1×10⁵
*
Control
PROK1
Cytomix
LPS

Supplementary Data :

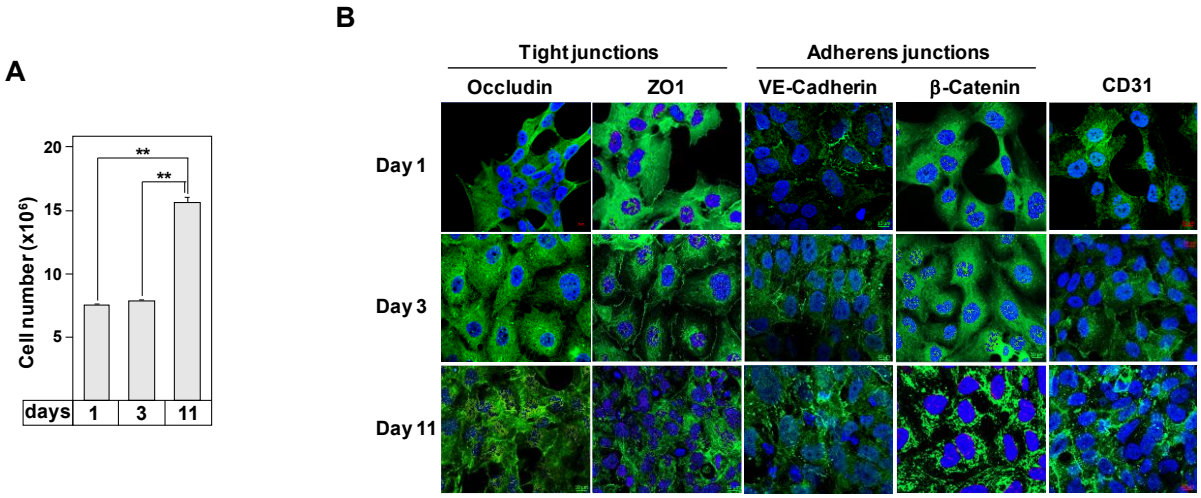


Figure S1. Evolution of cell density and junctional protein localization in HPMECs over time.

(A) Quantification of total cell number in P10 flasks at days 1, 3, and 11 of culture. Cell counts confirm a significant proliferative increase between days 3 and 11. Statistical analysis was performed using student-test. *P ≤ 0.05. **(B)** Representative immunofluorescence images of HPMECs cultured for 1, 3, and 11 days, stained for tight junction proteins (Occludin and ZO-1), adherens junction proteins (VE-cadherin and β-catenin), and the endothelial marker CD31 (green). Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). A progressive enrichment and organization of junctional markers at cell–cell contacts are observed over time, reflecting the maturation of the endothelial barrier. Scale bar: 10 µm.

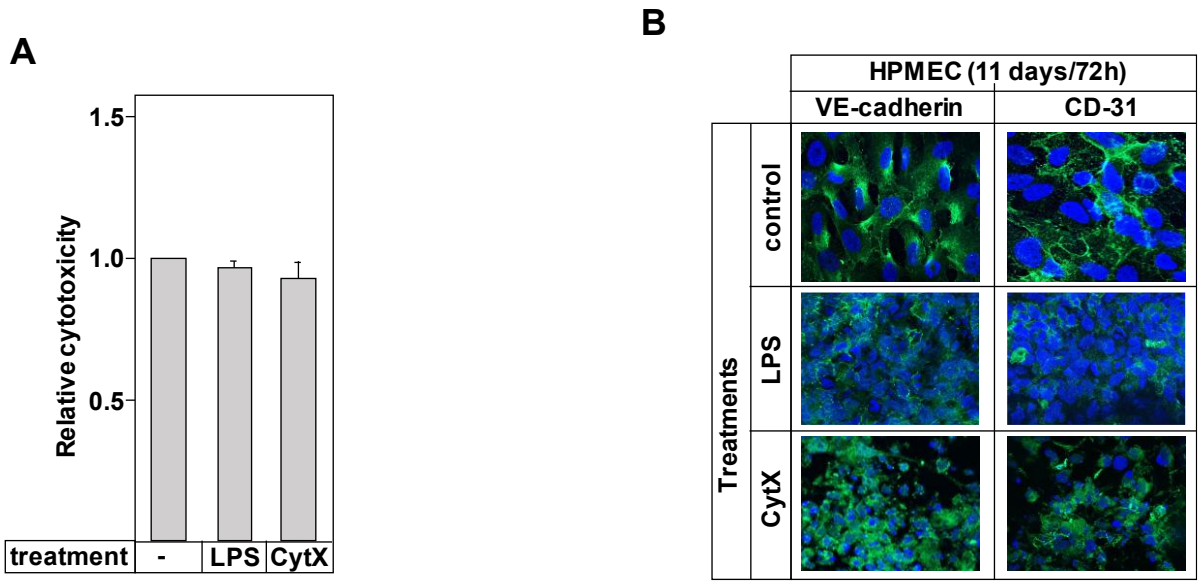


Figure S2. Impact of inflammatory stimuli on HPMEC viability and junctional organization. **(A)** Assessment of cytotoxicity in HPMECs treated for 72 hours with LPS or Cytomix, as determined by a cell viability assay. **(B)** Representative immunofluorescence images of VE-cadherin and CD31 expression (green) in HPMECs cultured for 11 days and treated with LPS or Cytomix for 72 hours. Nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bar: 10 µm.

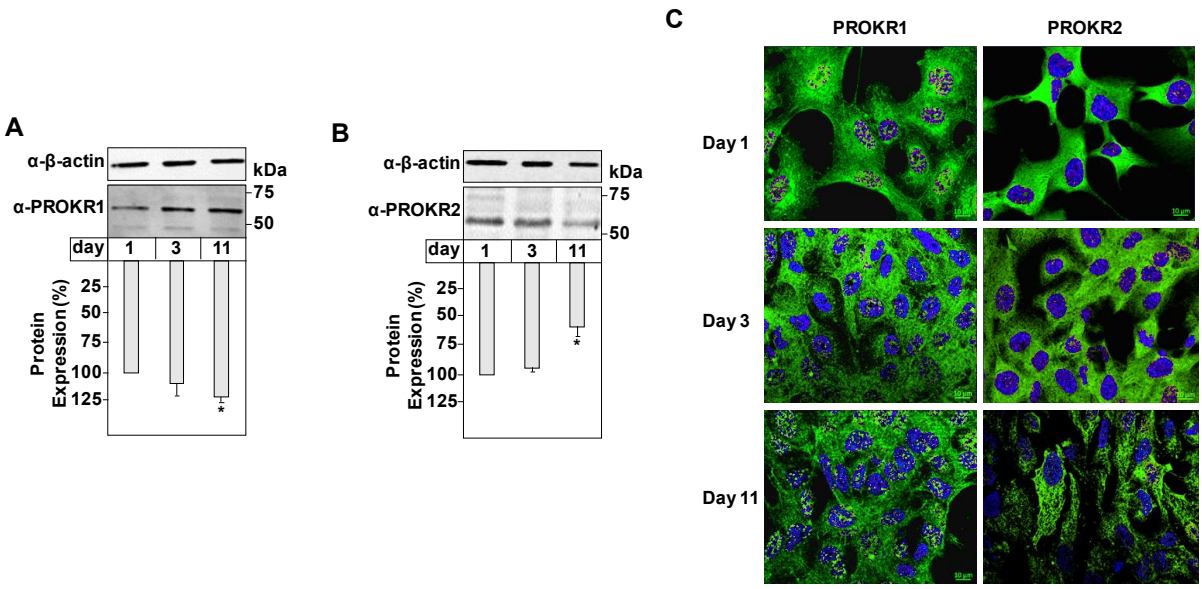


Figure S3. Temporal expression and localization of PROKR1 and PROKR2 in HPMECs.

(A, B) Western blot analysis of PROKR1 (**A**) and PROKR2 (**B**) in HPMEC lysates (40 µg) collected at days 1, 3, and 11 of culture. β-actin was used as loading control. PROKR1 expression increased over time, while PROKR2 expression decreased, indicating reciprocal regulation during endothelial maturation. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *P ≤ 0.05. **(C)** Immunofluorescence staining for PROKR1 and PROKR2 (green) in HPMECs cultured for 1, 3, and 11 days. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). Scale bar: 10 µm.

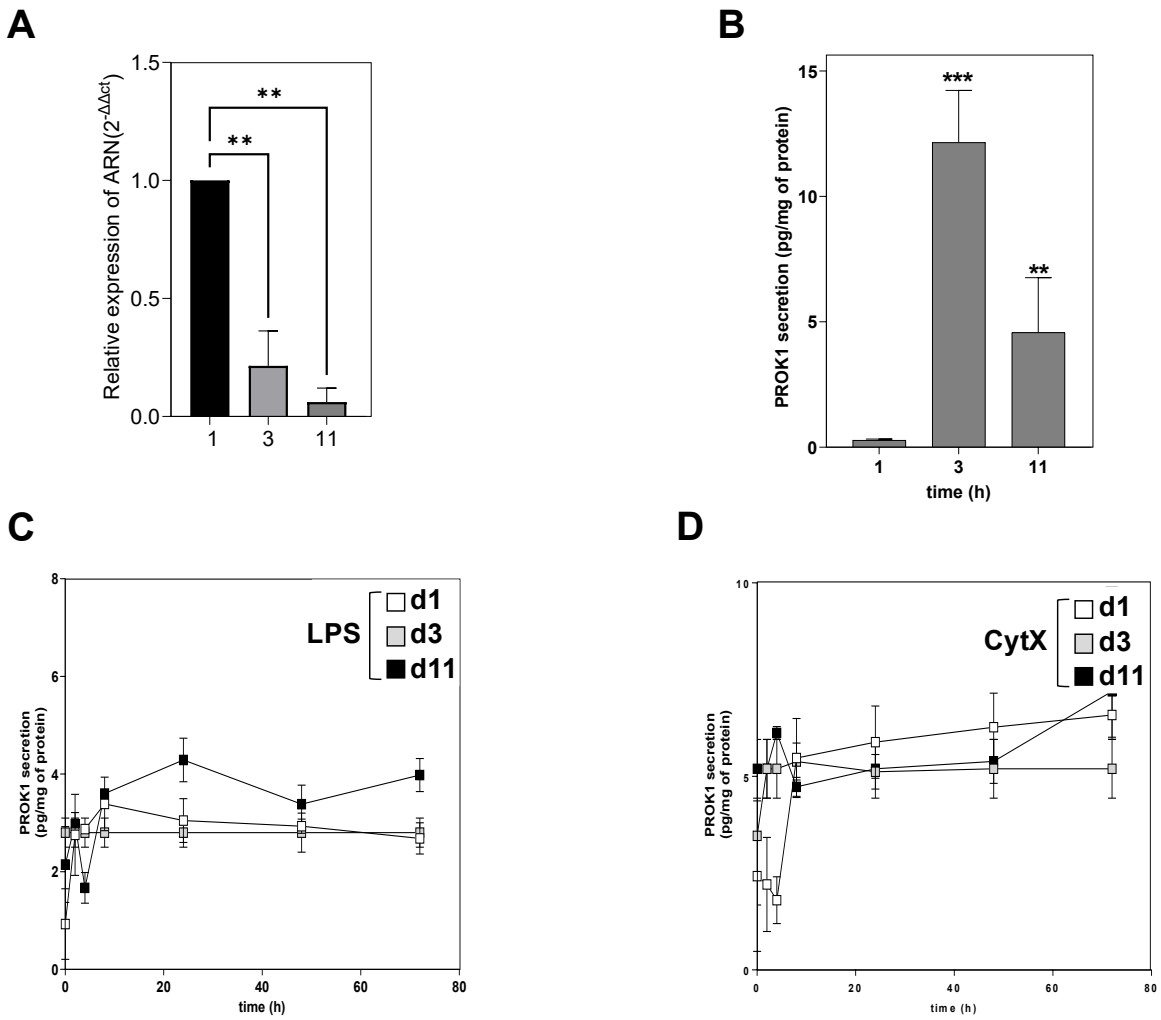


Figure S4. Expression and secretion of PROK1 under basal and LPS/Cytomix stimulated conditions in HPMECs.

(A) Quantification of PROK1 mRNA expression in HPMECs cultured for 1, 3, and 11 days under basal (untreated) conditions, as assessed by RT-qPCR. Data were normalized to GAPDH expression. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. **P ≤ 0.01. **(B)** ELISA-based quantification of secreted PROK1 protein in the conditioned media of HPMECs at days 1, 3, and 11. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001. **(C, D)** Measurement of PROK1 secretion following treatment with LPS (C) or Cytomix (D) at days 1, 3, and 11 of culture. PROK1 levels were determined by sandwich ELISA and normalized to total protein content.

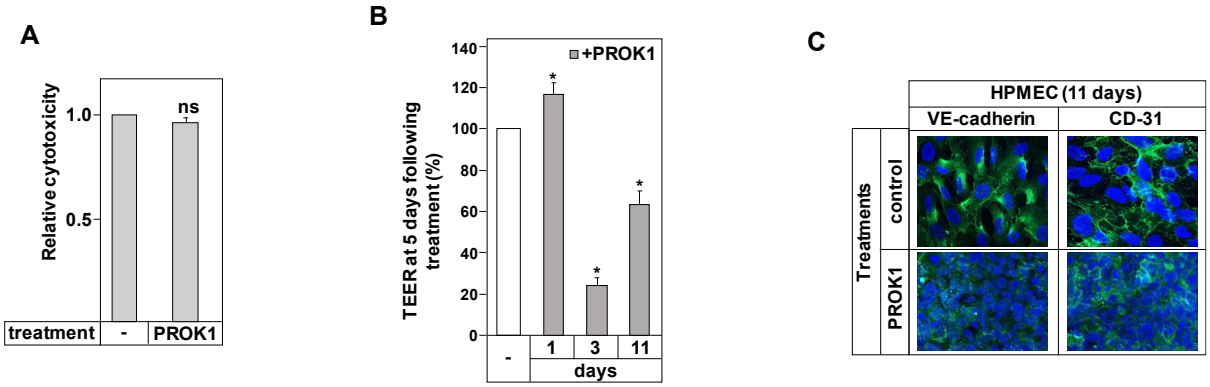


Figure S5. PROK1 treatment modulates HPMEC viability, barrier function, and junctional protein expression.

(A) Assessment of cell viability in HPMECs treated with PROK1 (25 nM) for 72 hours. No significant cytotoxicity was detected relative to untreated controls, confirming that PROK1 does not impair cell survival under the conditions used. **(B)** Relative variation in TEER values (% of untreated control) following PROK1 treatment, initiated at 24 hours, 3 days, or 11 days of culture and maintained for 5 days. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *P ≤ 0.05.

(C) Immunofluorescence staining of VE-cadherin and CD31 (green) in HPMECs cultured for 11 days and treated with PROK1 for 72 hours. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue).

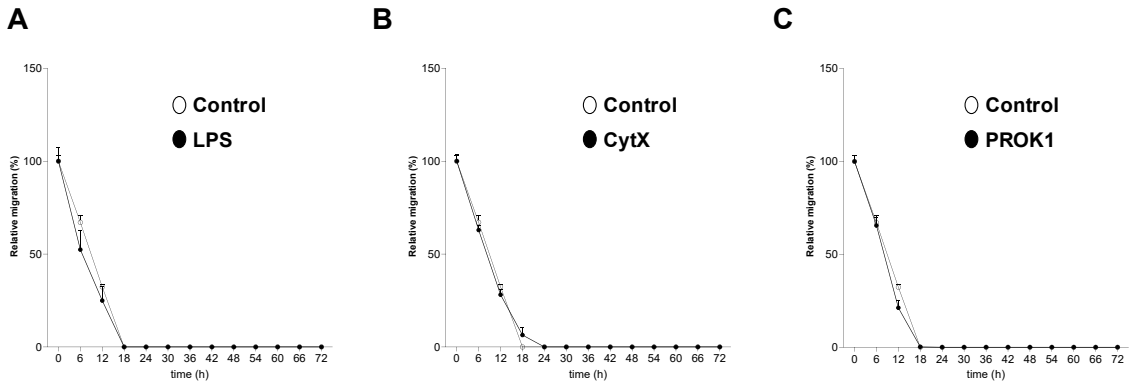


Figure S6. Effect of LPS, Cytomix, and PROK1 on HPMEC migration.

(A–C) Wound healing assays were performed on HPMEC monolayers cultured in EBM-2 medium and treated with LPS (**A**), Cytomix (**B**), or PROK1 (**C**). Migration was monitored using the CellCyteX imaging system, and wound closure was quantified over time.

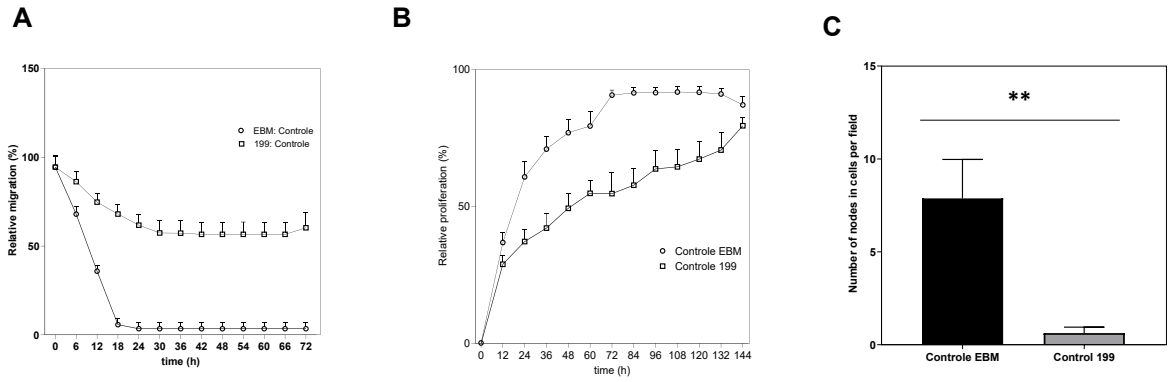


Figure S7. Impact of culture medium on HPMEC angiogenic functions.

(A) HPMEC migration was assessed using wound healing assays in EBM-2 versus M199 + 20% FBS media. **(B)** Cell proliferation in EBM-2 versus M199 was monitored over time using CellCyteX imaging. **(C)** Quantification of branching points after 5 hours of culture on Matrigel in both media. Cells in M199 formed fewer pseudo-tubes than in EBM-2, further supporting the suppressive effect of M199 on angiogenic behavior. Statistical analysis was performed using student-test. **$P \leq 0.01$.

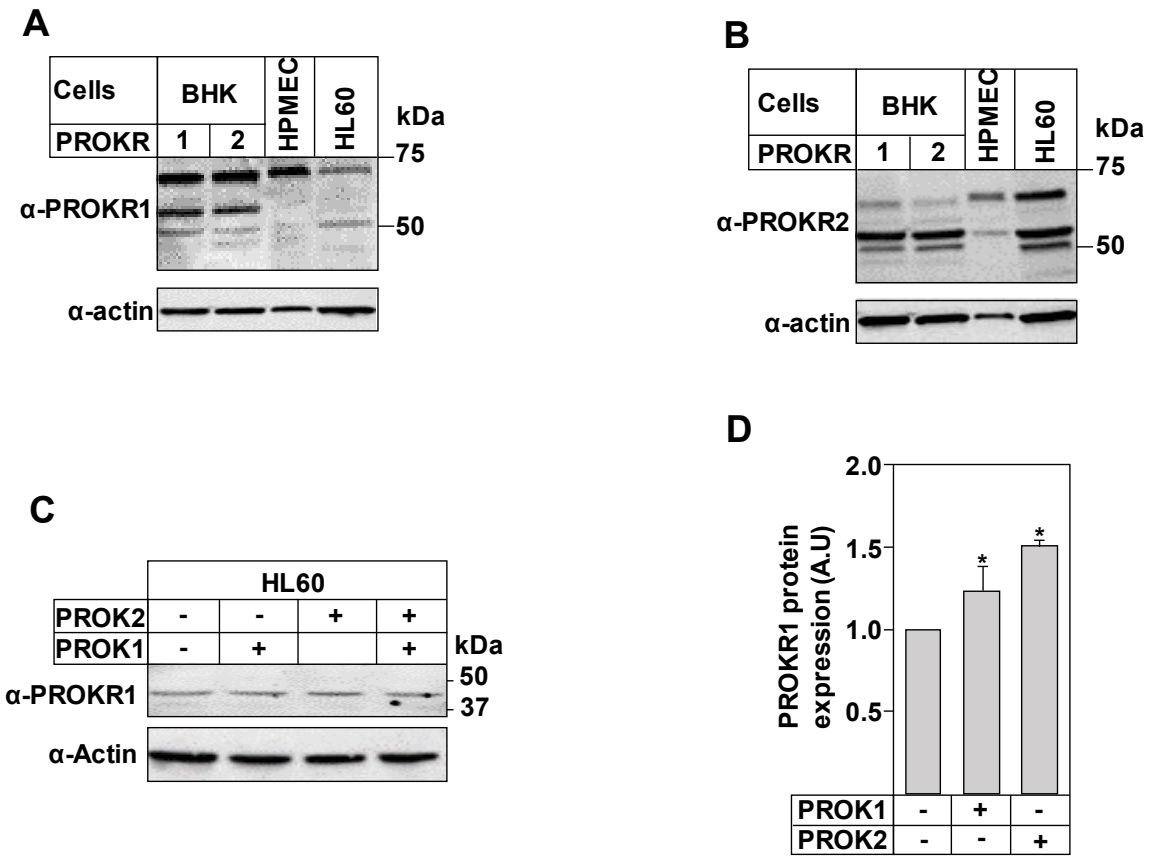


Figure S8. Expression of prokineticin receptors in HL-60 cells and effect of ligands, PROK1 and PROK2.

(A–B) Western blot analysis of PROKR1 (**A**) and PROKR2 (**B**) in HL-60 cells, BHK cells stably transfected with PROKR1 (BHK-R1) or PROKR2 (BHK-R2), and HPMECs. **(C–D)** HL-60 cells were treated for 72 hours with PROK1, PROK2, or the activation mix (vitamin D3 + indomethacin). (**C**) Western blot analysis showed the expression profile of PROKR1 following PROK1 or PROK2 treatment. (D) Quantification of PROKR1 expression in HL60 following treatment with PROK1 or PROK2. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. *$P \leq 0.05$.

Discussion

Dans ce travail, nous avons caractérisé la maturation fonctionnelle des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC-ST1.6R, dénommée HPMEC) *in vitro* et évalué leur réponse à trois types de stimuli : inflammatoire (Cytomix), infectieux (LPS) et angiogénique, la prokinéticine 1 (PROK1). Nos résultats révèlent que la maturation endothéliale est un processus dynamique, influençant fortement la sensibilité des cellules aux différents stimuli, et mettent en évidence un nouveau rôle pour la PROK1 dans l'altération de l'intégrité de la barrière vasculaire pulmonaire.

La maturation des HPMECs, suivie sur une période de 25 jours, s'accompagne d'une augmentation progressive de la résistance transendothéliale (TEER), d'une diminution de la perméabilité paracellulaire et d'une grande capacité à former des structures tubulaires, suggérant que l'acquisition d'un phénotype endothélial fonctionnel se fait de façon progressive. Cette évolution est corrélée à une surexpression temporelle de marqueurs endothéliaux (CD31, CD34, vWf, VEGFR2) et de protéines de jonction (occludine, ZO-1, VE-cadhérine, β-caténine), en accord avec les données de la littérature sur l'organisation de la barrière endothéliale. Ces résultats valident l'utilisation du modèle HPMEC-ST1.6R comme outil pertinent pour l'étude des dynamiques de la barrière microvasculaire pulmonaire.

Nous avons ensuite démontré que le degré de différenciation cellulaire module la réponse aux stimuli inflammatoires. À un stade immature (J+3), les cellules présentent une plus grande vulnérabilité aux perturbateurs de la barrière, traduite par une chute de TEER et une sécrétion significative d'IL-6 et d'IL-8. À l'inverse, les HPMECs matures (J+11) montrent une perte partielle de la résistance, confirmant le rôle protecteur des jonctions matures contre les stress inflammatoires. Ces données soulignent l'importance de prendre en compte le stade de différenciation dans les modèles *in vitro* de dysfonction endothéliale.

Un résultat inédit de notre étude concerne la dynamique d'expression des récepteurs de PROK1. Nous observons une augmentation significative de PROKR1 et une diminution parallèle de PROKR2 au cours de la maturation en présence de stimuli (LPS, Cytomix et PROK1), suggérant un basculement dans le profil de signalisation des PROKs dans les HPMECs. Cette observation, jamais décrite dans l'endothélium pulmonaire, pourrait refléter un changement fonctionnel des récepteurs selon le contexte de développement ou des stimuli.

En réponse à PROK1, nous mettons en évidence des altérations majeures de la barrière endothéliale : diminution de la TEER, désorganisation de la distribution membranaire de VE-cadhérine et CD31, et sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8).

Ces effets, comparables à ceux de LPS ou CytX, révèlent pour la première fois que PROK1 agit comme un perturbateur actif de l'intégrité vasculaire pulmonaire. De manière intéressante, sur des cellules très jeunes (J+1), PROK1 induit d'abord une augmentation transitoire de la TEER avant de la faire chuter, ce qui suggère un effet biphasique dépendant du répertoire de récepteurs exprimés et des voies de signalisation activées.

Concernant ses effets angiogéniques, PROK1 n'a montré d'activité significative que dans un milieu faiblement supplémenté (M199), avec stimulation de la prolifération, migration, invasion et formation de tubes. En revanche, dans un milieu riche (EBM-2), ses effets étaient masqués, probablement en raison de la présence de VEGF, EGF et FGF-2. Ces résultats renforcent l'idée que l'action de PROK1 est contextuelle, dépendante de l'environnement extracellulaire et du niveau basal d'activation des cellules endothéliales.

Enfin, nous rapportons pour la première fois que PROK1 favorise l'adhésion et la transmigration de cellules myéloïdes HL-60 à travers la monocouche endothéliale. Cet effet, bien que moins marqué que celui médié par le LPS, est significatif et comparable à celui du Cytomix. Il suggère une implication de PROK1 dans le recrutement leucocytaire pulmonaire, à la fois via l'activation endothéliale et peut-être par une action directe sur les cellules immunitaires neutrophilaires dans lesquelles nous avons détecté l'expression du PROKR1 et PROKR2.

Conclusions et perspectives

Nos résultats positionnent PROK1 comme un acteur clé de la physiopathologie endothéliale pulmonaire, capable d'altérer la perméabilité, de déclencher une réponse inflammatoire, de moduler l'angiogenèse et de faciliter la transmigration immunitaire. Ces effets sont fortement modulés par le degré de maturation endothéliale et le micro-environnement vasculaire.

Ces résultats ouvrent plusieurs perspectives. D'une part, l'étude des voies de signalisation spécifiques activées par PROKR1 et PROKR2 dans l'endothélium pulmonaire, notamment les voies MAPK, PI3K/AKT, Rho-GTPase, apparaît essentielle pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. D'autre part, une validation dans des modèles *ex vivo* plus physiologiques (organoïdes pulmonaires, coupes de poumon humain) sera indispensable pour confirmer la pertinence translationnelle de ces observations.

Enfin, dans le contexte des pathologies inflammatoires chroniques pulmonaires (mucoviscidose, asthme, BPCO), PROK1 pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante pour limiter l'hyperperméabilité vasculaire et l'infiltration immunitaire.

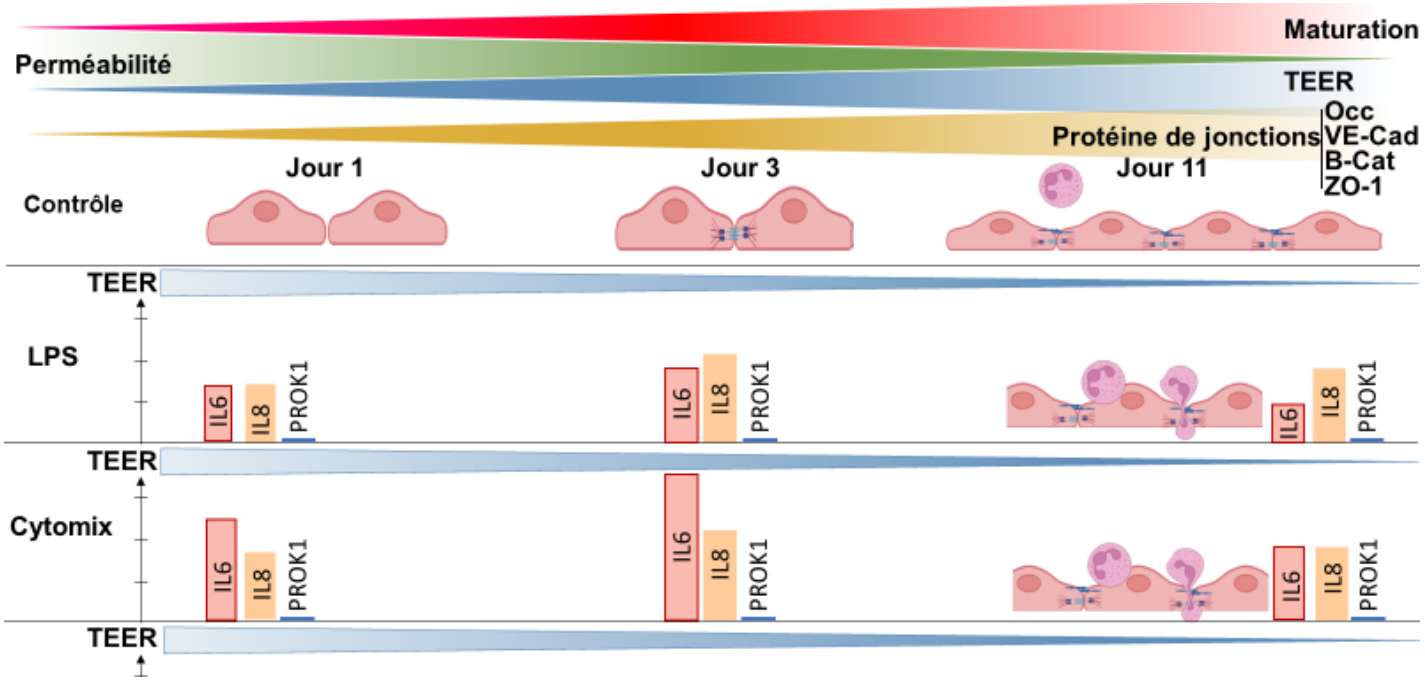


Figure 31 : Maturation des HPMEC et modulation de la réponse inflammatoire selon le stade de différenciation
Schéma illustrant l'évolution des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC) en culture de J1 à J11. Le gradient en haut reflète : En rouge, la progression de la maturation cellulaire, En vert, la diminution de la perméabilité, En bleu, l'augmentation de la résistance électrique transendothéliale (TEER), En jaune, l'établissement progressif des protéines de jonction (Occludine, VE-Cadhérine, β-caténine, ZO-1). Les barres verticales indiquent la sécrétion relative de cytokines (IL-6, IL-8) et de PROK1 après stimulation par LPS, Cytomix ou PROK1 aux différents temps de maturation. Les effets morphologiques observés à J11 incluent une altération de la barrière endothéliale et la transmigration des neutrophiles. Ce schéma met en évidence l'importance du stade de maturation dans la réponse inflammatoire et la régulation de la perméabilité vasculaire.

Discussion générale

Discussion générale

Cette thèse s'inscrit dans un programme de recherche engagé depuis plus de quinze ans au sein de l'équipe, centré sur l'étude des prokinéticines (PROK1, PROK2) et de leurs récepteurs (PROKR1, PROKR2), impliqués dans divers processus pathologiques. Parmi les axes explorés, la mucoviscidose constitue un modèle particulièrement pertinent pour interroger les liens entre inflammation chronique, dérégulation épithéliale et atteinte vasculaire.

L'objectif principal de ce travail était d'examiner le dialogue fonctionnel entre l'épithélium bronchique et l'endothélium vasculaire dans un contexte de mucoviscidose, en portant une attention particulière au rôle des prokinéticines comme médiateurs potentiels de cette interaction. Pour cela, la thèse s'est structurée autour de deux volets complémentaires. Le premier a consisté à analyser l'impact des modulateurs pharmacologiques de CFTR sur l'inflammation épithéliale, en particulier dans les cellules exprimant la mutation F508del. Le second volet a porté sur la réponse de l'endothélium microvasculaire pulmonaire humain (HPMEC) à des stimuli pro-inflammatoires (LPS, Cytomix) ou à PROK1, un ligand encore peu exploré dans ce contexte.

Nos résultats montrent que, malgré une restauration partielle de la fonction CFTR à la membrane sous l'effet des modulateurs, le profil inflammatoire des cellules épithéliales reste largement altéré. À l'inverse, une correction génique complète, via l'expression de CFTR sauvage, permet une normalisation plus efficace. Cette observation suggère que le repliement correct de CFTR conditionne sa capacité à réguler les voies inflammatoires intracellulaires, au-delà de sa seule fonction de canal ionique. Le défaut de conformation apparaît ainsi comme un facteur inflammatoire qui donne a CFTR un autre rôle que cellules de canal.

Le second volet de la thèse a permis d'explorer les réponses de l'endothélium microvasculaire pulmonaire (HPMEC-ST1.6R) face à différents types d'agressions, en tenant compte de leur état de maturation. Nous avons observé que la maturation progressive *in vitro* de ces cellules s'accompagne d'un renforcement de la barrière vasculaire, mesuré par une augmentation de la résistance transendothéliale (TEER), une réduction de la perméabilité paracellulaire et une organisation accrue des jonctions d'adhérence. Ce modèle a permis de démontrer que la réactivité de l'endothélium face aux stimuli inflammatoires dépend étroitement du degré de différenciation cellulaire : les cellules jeunes se montrent plus vulnérables que les cellules

matures. Ces résultats soulignent l'importance de prendre en compte le contexte maturationnel dans les études de dysfonction endothéliale, une variable souvent négligée dans les approches *in vitro*.

Parmi les stimuli testés, PROK1 s'est distinguée par sa capacité à perturber l'intégrité de la barrière endothéliale. En induisant une chute du TEER, une désorganisation des jonctions d'adhérence (VE-cadhérine, CD31), et une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires, PROK1 mime les effets de LPS ou de Cytomix. De plus, son action favorise l'adhésion et la transmigration de cellules myéloïdes. Ce travail met ainsi en évidence, pour la première fois, un rôle délétère direct de PROK1 sur l'endothélium pulmonaire en conditions inflammatoires.

L'ensemble de ces observations suggère un modèle dans lequel l'inflammation chronique épithéliale, liée à l'expression d'un CFTR mal conformé, maintient un microenvironnement pro-inflammatoire propice à l'induction de médiateurs tels que PROK1. En retour, PROK1 exacerbe la rupture de la barrière endothéliale, favorisant l'infiltration leucocytaire et la fuite vasculaire, contribuant ainsi à l'aggravation des lésions pulmonaires. Ce crosstalk épithélio-endothélial pathologique pourrait représenter un maillon essentiel dans la compréhension des atteintes respiratoires de la mucoviscidose.

Par ailleurs, nos résultats indiquent que la composition du milieu de culture influence la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Il serait donc pertinent de se demander si ces conditions peuvent également moduler leur réponse inflammatoire, ainsi que l'expression des protéines de jonction ou d'adhésion. Cette variabilité expérimentale invite à une analyse plus fine du rôle de l'environnement extracellulaire dans la régulation de la perméabilité vasculaire.

Enfin, à la lumière de ces données, on peut émettre l'hypothèse qu'un épithélium mucoviscidosique traité par des modulateurs, mais toujours avec une inflammation basale, continue à sécréter des cytokines capables d'agir sur l'endothélium adjacent. Ce phénomène pourrait entretenir l'activation des cellules endothéliales et la transmigration des neutrophiles, contribuant ainsi à un cercle vicieux d’inflammation et à la progression du remodelage tissulaire pulmonaire.

Conclusions générales

Conclusions générales

Au cours de cette thèse, nous avons exploré les mécanismes d'inflammation pulmonaire à travers deux axes complémentaires. Le premier s'est concentré sur le compartiment épithélial bronchique, en particulier sur le rôle du repliement de la protéine CFTR dans la régulation de la réponse inflammatoire. Le second a porté sur l'endothélium pulmonaire, en étudiant sa maturation fonctionnelle et sa réponse à différents stimuli inflammatoires, notamment à la prokinéticine 1 (PROK1), un facteur encore peu étudié dans ce contexte.

Dans le premier volet, nous avons montré que les cellules exprimant la mutation F508del de CFTR conservent un profil pro-inflammatoire élevé, même après traitement par modulateurs pharmacologiques. En revanche, une correction génique complète, par expression de la forme sauvage de CFTR, permet une normalisation plus efficace de la réponse immunitaire. Ces résultats suggèrent que la présence de CFTR à la membrane, bien que nécessaire, n'est pas suffisante pour restaurer l'homéostasie cellulaire. En effet, la conformation structurale correcte de la protéine apparaît comme un facteur essentiel, conditionnant non seulement sa fonction canal ionique, mais aussi son rôle dans la régulation de voies intracellulaires impliquées dans l'inflammation. Ces observations remettent en cause l'idée selon laquelle la récupération du transport ionique constitue le seul objectif thérapeutique, et soulignent l'importance de prendre en compte les fonctions extra-canales de CFTR, notamment celles liées à son repliement.

Dans le second volet, nous avons caractérisé les propriétés de l'endothélium microvasculaire pulmonaire humain (HPMEC) au cours de sa maturation in vitro, en analysant sa sensibilité aux agressions inflammatoires. Il ressort que le degré de différenciation cellulaire module fortement la réponse inflammatoire : les cellules jeunes se montrent plus sensibles aux stimuli que les cellules matures. L'un des résultats majeurs de ce travail concerne le rôle de PROK1, qui induit une altération marquée de l'intégrité de la barrière endothéliale. Cette perturbation se traduit par une diminution de la résistance électrique transendothéliale, une désorganisation des jonctions d'adhérence, une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires, et une augmentation de l'adhésion et de la transmigration des cellules immunitaires. Ces effets, comparables à ceux induits par des stimuli classiques comme LPS ou Cytomix, positionnent PROK1 comme un acteur majeur de la rupture de barrière vasculaire dans un contexte inflammatoire. La mise en regard de ces deux volets expérimentaux permet de proposer un modèle intégré dans lequel un épithélium CF muté, partiellement corrigé par les modulateurs, continue à produire un environnement inflammatoire favorable à l'activation de l'endothélium voisin.

Parmi les médiateurs potentiellement impliqués dans cette communication intercellulaire, PROK1 apparaît comme un candidat pertinent. Il pourrait jouer un rôle de relais entre l'inflammation chronique de l'épithélium et la rupture de barrière vasculaire, contribuant ainsi à l'infiltration leucocytaire et à l'entretien du cercle vicieux inflammatoire dans le tissu pulmonaire.

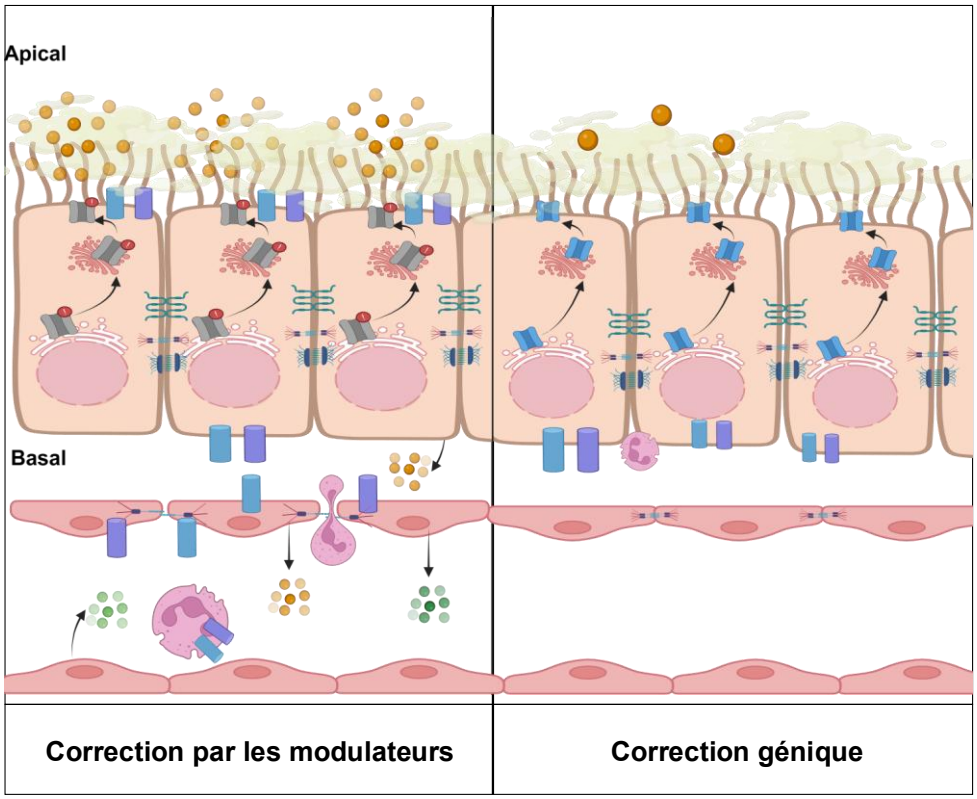


Figure 32 : Impact différencié des stratégies de correction de CFTR sur l'inflammation et la barrière épithélio-endothéliale dans la mucoviscidose
Illustration comparative des effets de deux approches thérapeutiques sur le microenvironnement bronchique dans la mucoviscidose : la correction par modulateurs pharmacologiques (à gauche) et la correction génique (à droite). Dans la condition "modulateur", la restauration partielle de CFTR à la membrane apicale ne corrige pas complètement son repliement. Cela entraîne un maintien de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, une perturbation des échanges ioniques et hydriques, et une activation du compartiment endothélial sous-jacent. Cette activation favorise l'adhésion et la transmigration de cellules HL-60, modèle de leucocytes, traduisant une altération du contrôle de la barrière vasculaire. À l'inverse, la correction génique permet l'expression d'un CFTR correctement conformé, assurant une fonction ionique normale et limitant la réponse inflammatoire. Le tissu retrouve un phénotype proche du physiologique, avec un épithélium stable, une barrière endothéliale intacte, et l'absence de recrutement leucocytaire.

Ces résultats ouvrent plusieurs pistes pour des recherches futures. D'un point de vue thérapeutique, ils suggèrent que le ciblage combiné du repliement de CFTR et de la signalisation inflammatoire pourrait améliorer la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose. En particulier, l'identification de composés capables de stabiliser la conformation native de CFTR, ou d'inhiber les effets délétères agent inflammatoire dont les prokinéticines sur l'endothélium, pourrait représenter une stratégie prometteuse.

Par ailleurs, il serait pertinent d'étudier plus en détail l'effet de la mutation F508del dans les cellules endothéliales elles-mêmes : leur sensibilité au stress, leur capacité à répondre aux cytokines, ainsi que leur propre production de PROK1, restent à explorer.

Ainsi, cette thèse propose une approche intégrée de la physiopathologie inflammatoire de la mucoviscidose, reliant des altérations moléculaires du repliement protéique à des dérégulations tissulaires systémiques. Elle ouvre la voie à une vision plus globale, dans laquelle la barrière épithéliale et la barrière vasculaire interagissent pour entretenir l'inflammation pulmonaire chronique. Comprendre et cibler ces interactions pourrait constituer une avancée majeure dans la lutte contre le déclin progressif de la fonction respiratoire chez les patients atteints de mucoviscidose.

Perspectives

Perspectives

I. Approfondissement des modèles cellulaires épithéliaux et endothéliaux pulmonaires

A. Étude des effets de PROK1 et PROK2 sur l'intégrité des barrières

Les cellules épithéliales bronchiques humaines (HBE) expriment PROK1 ainsi que ses récepteurs, et sécrètent cette cytokine à la fois du côté apical et basolatéral (Chauvet et al., 2015).Cette double polarité suggère une action autocrine sur l'épithélium bronchique et une action paracrine sur l'endothélium pulmonaire sous-jacent. Si les prokinéticines sont bien connues pour leur rôle angiogénique et pro-inflammatoire dans des contextes tels que la reproduction, la vascularisation tumorale ou l'ischémie (Monnier & Samson, 2010; Lattanzi et al., 2022), leur implication dans la régulation de la barrière alvéolo-capillaire reste encore peu explorée.

Nous proposerons une caractérisation comparative des effets de PROK1 et PROK2 sur la perméabilité, la production de cytokines et l'intégrité des barrières, à la fois en monoculture (HBE ou HPMEC) et en coculture (systèmes Transwell), afin de mieux comprendre la communication croisée entre les deux compartiments. Ces analyses seront réalisées en conditions basales et dans des contextes stimulés (Cytomix, infection bactérienne, stimulation directe par PROK1/2). Les mesures incluront la TEER, le passage de FITC-dextran, l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine) et la localisation des protéines jonctionnelles (occludine, ZO-1, VE-cadhérine, CD31). Nous faisons l'hypothèse que PROK1 exercera des effets plus marqués que PROK2 sur la perméabilité et l'activation inflammatoire, en accord avec son rôle pro-inflammatoire décrit dans d'autres tissus.

B. Rôle du milieu de culture sur la réponse endothéliale

La composition du milieu de culture constitue un facteur déterminant pour l'interprétation des réponses cellulaires. Les HPMEC sont souvent cultivées dans des milieux enrichis contenant des facteurs exogènes, ce qui peut interférer avec leur profil de réponse intrinsèque. Afin de limiter ces biais, nous proposons d'étudier les réponses des HPMEC dans un milieu minimaliste tel que le M199, déjà utilisé dans des modèles endothéliaux pour sa composition réduite en cytokines et facteurs de croissance. Cette approche permettra de mettre en évidence

la production endogène de cytokines, l'activation des voies intracellulaires et l'organisation des jonctions intercellulaires en réponse à des stimuli inflammatoires et prokinéticiniques, sans interférence externe. Ce choix méthodologique nous donnera une vision plus fidèle des mécanismes propres à l'endothélium pulmonaire.

C. Étude de l'expression et de la localisation des protéines jonctionnelles

Au-delà de son rôle de canal ionique, CFTR a été impliqué dans la régulation de la signalisation intracellulaire et pourrait interagir avec les complexes jonctionnels (Becq, 2011). Les jonctions serrées (occludine, ZO-1) et adhérentes (VE-cadhérine, CD31) sont essentielles au maintien de l'intégrité endothéliale. Afin de comprendre l'influence de CFTR et des prokinéticines sur ces structures, nous analyserons leur expression et leur localisation à différents temps de maturation (J1, J3, J11) dans des HPMEC, en conditions basales et stimulées (LPS, Cytomix, PROK1). Ces analyses combineront RT-qPCR, western blot et immunofluorescence. L'utilisation de modèles génétiquement invalidés pour CFTR, PROKR1 et PROKR2 permettra d'identifier les contributions respectives de ces gènes dans l'assemblage et la stabilité des complexes jonctionnels. Ces travaux, déjà initiés, devraient permettre de mieux comprendre le rôle de CFTR et des prokinéticines dans la régulation structurelle de la barrière endothéliale.

II. Développement d'un modèle endothélial CFTR-dF508

A. Génération et validation du modèle

La mutation ΔF508, présente chez près de 85 % des patients atteints de mucoviscidose (Chillón et al., 1995 ; Du et al., 2014), entraîne un défaut de repliement de CFTR et sa rétention dans le réticulum endoplasmique. La création d'un modèle endothélial HPMEC portant cette mutation par édition CRISPR-Cas9 constitue une étape essentielle pour comprendre les conséquences directes de cette altération sur la barrière vasculaire. Ce modèle sera validé par séquençage et par une analyse fonctionnelle de CFTR incluant son expression, sa localisation et sa capacité de transport ionique.

B. Étude de la réponse inflammatoire et de la sensibilité aux prokinéticines

Les HPMEC sauvages et mutées seront comparées pour leur réponse inflammatoire. L'expression de cytokines (IL-6, IL-8, TNF-α) et de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) sera quantifiée, et la perméabilité de la barrière évaluée par TEER et FITC-dextran. La sensibilité aux prokinéticines sera également analysée pour déterminer si la mutation ΔF508 amplifie les effets délétères de PROK1/2.

C. Rôle de CFTR dans l'établissement et le maintien de la barrière

L'organisation des jonctions intercellulaires sera examinée dans les modèles sauvages et mutés. Les protéines occludine, ZO-1, VE-cadhérine et CD31 seront analysées par western blot et immunofluorescence, et leur dynamique corrélée aux mesures de TEER et à la progression de la maturation de la barrière. Ces travaux permettront de déterminer si CFTR joue un rôle structurel dans l'établissement et la stabilité des jonctions endothéliales.

D. Effet des correcteurs de CFTR

Enfin, l'effet de modulateurs pharmacologiques tels que VX-809, VX-661 et VX-445 sera évalué sur les HPMEC-dF508. Ces molécules, déjà utilisées avec succès pour restaurer le repliement de CFTR dans l'épithélium bronchique, pourraient améliorer la résistance de la barrière et réduire la réponse inflammatoire dans l'endothélium. Leur efficacité dans ce compartiment fournirait des informations nouvelles sur l'action des correcteurs dans la mucoviscidose.

III. Modélisation de l'interaction épithélium–endothélium

A. Co-cultures HBE–HPMEC

Les co-cultures sur inserts poreux entre HBE et HPMEC permettront de reproduire in vitro la barrière bronchio-capillaire. Ce modèle offrira l'opportunité d'étudier les effets d'une stimulation inflammatoire ou infectieuse appliquée à l'épithélium sur l'endothélium sous-jacent, et de mettre en évidence la communication intercellulaire entre les deux compartiments.

B. Co-cultures CFBE–HPMEC-dF508

La mise en place de co-cultures associant CFBE-dF508 et HPMEC-dF508 reproduira un contexte pathologique plus fidèle à la mucoviscidose. Ce modèle permettra d'explorer les effets combinés de la mutation CFTR sur l'épithélium et l'endothélium, notamment en termes de dérégulation de la barrière, de sécrétion de cytokines et d'activation de voies inflammatoires.

C. Étude de la transmigration leucocytaire à travers les bicouches

Les cocultures serviront également de support pour l'étude de la transmigration neutrophilaire. Des cellules HL-60 différenciées seront ajoutées en présence ou non d'un gradient de SDF-1α, et leur passage à travers les monocouches et bicouches sera mesuré. L'impact de la mutation CFTR et l'effet des modulateurs seront analysés, afin de préciser le rôle de CFTR dans le recrutement et la migration des leucocytes.

IV. Rôle fonctionnel de CFTR dans la régulation des barrières pulmonaires

A. Étude des interactions CFTR–PROK1

Les interactions entre CFTR et PROK1 seront explorées dans les HBE et les HPMEC. L'effet de PROK1 sur l'expression et l'activité de CFTR sera évalué par RT-qPCR, western blot et mesures de transport ionique en chambre d'Ussing. En parallèle, l'inhibition pharmacologique (inh-172) ou génétique (CRISPR-Cas9) de CFTR permettra d'évaluer son rôle direct dans la perméabilité et la signalisation induite par PROK1.

B. Implication de CFTR dans l'adhésion et la transmigration leucocytaire

L'impact de CFTR sur la régulation des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine) sera évalué, ainsi que son rôle dans l'adhésion et la transmigration leucocytaire en présence ou non de PROK1/2. Ces analyses permettront de préciser si CFTR agit comme un régulateur permissif de la cascade inflammatoire dans la mucoviscidose.

V. Influence de la maturation cellulaire sur la sensibilité à PROK1/2

La maturation cellulaire influence la polarisation et la sensibilité aux stimuli. Nous analyserons si la durée de culture (J1, J3, J11), la confluence et la polarisation en ALI modulent la réponse de HBE et CFBE à PROK1/2. L'expression de PROKR1/2, la sécrétion de cytokines et l'activation des voies ERK, AKT et p38 seront comparées, ainsi que la résistance de la barrière. L'objectif est de déterminer si la sensibilité aux prokinéticines est acquise progressivement ou si elle est altérée dans un contexte CFTR muté.

VI. Régulation de la sécrétion de prokinéticines par l'épithélium bronchique

L'épithélium bronchique pourrait constituer une source majeure de prokinéticines dans le poumon. Nous étudierons la capacité des HBE et CFBE à sécréter PROK1 et PROK2 en réponse à une stimulation inflammatoire (Cytomix) ou infectieuse (Pseudomonas aeruginosa). Les niveaux sériques seront quantifiés par ELISA et l'effet des modulateurs de CFTR sera testé. Cette approche permettra de relier le statut CFTR à la régulation de la production de PROK1/2 par l'épithélium.

VII. Cartographie des voies de signalisation activées par PROK1/2

Enfin, nous chercherons à identifier les voies de signalisation activées par PROK1 et PROK2 dans les différents modèles (HBE, CFBE, HPMEC, HPMEC-dF508, neutrophiles). Les cascades MAPK, AKT et NF-κB seront analysées par western blot phospho-spécifique. Les réponses seront comparées selon le statut CFTR, et l'effet des modulateurs sera testé. L'objectif est de déterminer si la mutation ΔF508 modifie le couplage récepteur–signalisation en aval des prokinéticines et si les modulateurs peuvent normaliser ces réponses.

Références

Références

Ackermann, M., Werlein, C., Plucinski, E., Leypold, S., Kühnel, M. P., Verleden, S. E., Khalil, H. A., Länger, F., Welte, T., Mentzer, S. J., & Jonigk, D. D. (2024). The role of vasculature and angiogenesis in respiratory diseases. *Angiogenesis*, *27*(3), 293-310. https://doi.org/10.1007/s10456-024-09910-2

Adams, R. H., & Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *8*(6), 464-478. https://doi.org/10.1038/nrm2183

Ahmad, A., Ahmed, A., & Patrizio, P. (2013). Cystic fibrosis and fertility. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, *25*(3), 167-172. https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e32835f1745

Aird, W. C. (2007a). Phenotypic heterogeneity of the endothelium : I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation Research*, *100*(2), 158-173. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a

Aird, W. C. (2007b). Phenotypic heterogeneity of the endothelium : II. Representative vascular beds. *Circulation Research*, *100*(2), 174-190. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255690.03436.ae

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Blood Vessels and Endothelial Cells. In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26848/

Alfaidy, N. (2016). Prokineticin1 and pregnancy. *Annales D'endocrinologie*, *77*(2), 101-104. https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.014

Alves, A. F., Vieira, G. C., Gadelha, F. A. A. F., Cavalcante-Silva, L. H. A., Martins, M. A., Barbosa-Filho, J. M., & Piuvezam, M. R. (2017). Milonine, an Alkaloid of Cissampelos sympodialis Eichl. (Menispermaceae) Inhibits Histamine Release of Activated Mast Cells. *Inflammation*, *40*(6), 2118-2128.

https://doi.org/10.1007/s10753-017-0652-z

Amano, H., Matsui, Y., Hatanaka, K., Hosono, K., & Ito, Y. (2021). VEGFR1-tyrosine kinase signaling in pulmonary fibrosis. *Inflammation and Regeneration*, *41*(1), 16. https://doi.org/10.1186/s41232-021-00166-7

Amoakon, J.-P., Mylavarapu, G., Amin, R. S., & Naren, A. P. (2024). Pulmonary Vascular Dysfunctions in Cystic Fibrosis. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *39*(4), 0. https://doi.org/10.1152/physiol.00024.2023

Andersen, Dorothy. H. (1938). CYSTIC FIBROSIS OF THE PANCREAS AND ITS RELATION TO CELIAC DISEASE : A CLINICAL AND PATHOLOGIC STUDY. *American Journal of Diseases of Children*, *56*(2), 344-399. https://doi.org/10.1001/archpedi.1938.01980140114013

Anderson, M. P., & Welsh, M. J. (1992). Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains. *Science (New York, N.Y.)*, *257*(5077), 1701-1704. https://doi.org/10.1126/science.1382316

Armulik, A., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circulation Research*, *97*(6), 512-523. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7

Ayers, M. M., & Jeffery, P. K. (1988). Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium. *The European Respiratory Journal*, *1*(1), 58-80.

Bals, R., & Hiemstra, P. S. (2004). Innate immunity in the lung : How epithelial cells fight against respiratory pathogens. *The European Respiratory Journal*, *23*(2), 327-333. https://doi.org/10.1183/09031936.03.00098803

Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, *392*(6673), 245-252. https://doi.org/10.1038/32588

Baroni, D. (2025). Unraveling the Mechanism of Action, Binding Sites, and Therapeutic Advances of CFTR Modulators : A Narrative Review. *Current Issues in Molecular*

Biology, *47*(2), 119. https://doi.org/10.3390/cimb47020119

Barriere, H., Bagdany, M., Bossard, F., Okiyoneda, T., Wojewodka, G., Gruenert, D., Radzioch, D., & Lukacs, G. L. (2009). Revisiting the role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and counterion permeability in the pH regulation of endocytic organelles. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(13), 3125-3141. https://doi.org/10.1091/mbc.e09-01-0061

Bazzoni, G. (2003). The JAM family of junctional adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology*, *15*(5), 525-530. https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00104-2

Bazzoni, G., & Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions : Molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological Reviews*, *84*(3), 869-901. https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2003

Becker, K. A., Riethmüller, J., Zhang, Y., & Gulbins, E. (2010). *The Role of Sphingolipids and Ceramide in Pulmonary Inflammation in Cystic Fibrosis*. https://doi.org/10.2174/1874306401004010039

Becq, F., Mirval, S., Carrez, T., Lévêque, M., Billet, A., Coraux, C., Sage, E., & Cantereau, A. (2022). The rescue of F508del-CFTR by elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (Trikafta) in human airway epithelial cells is underestimated due to the presence of ivacaftor. *European Respiratory Journal*, *59*(2). https://doi.org/10.1183/13993003.00671-2021

Bendixen, M. P., Jeppesen, M., Irazoki, O., Jensen, C. B., Wang, M., Petersen, J., Katzenstein, T. L., Pressler, T., Skov, M., Olesen, H. V., Jensen-Fangel, S., Qvist, T., Johansen, H. K., & TransformCF study group. (2025). Change in pulmonary pathogens three years after elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor : An observational study in the Danish cystic fibrosis cohort. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, S1198-743X(25)00408-2.

https://doi.org/10.1016/j.cmi.2025.08.012

Benharouga, M., Haardt, M., Kartner, N., & Lukacs, G. L. (2001). COOH-terminal truncations promote proteasome-dependent degradation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from post-Golgi compartments. *The Journal of Cell Biology*, *153*(5), 957-970. https://doi.org/10.1083/jcb.153.5.957

Berger, A. (2000). Th1 and Th2 responses : What are they? *BMJ : British Medical Journal*, *321*(7258), 424. https://doi.org/10.1136/bmj.321.7258.424

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, *5*(1), 9-19. https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613

Blotas, C., Férec, C., & Moisan, S. (2023). Tissue-Specific Regulation of CFTR Gene Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(13), 10678. https://doi.org/10.3390/ijms241310678

Boers, J. E., Ambergen, A. W., & Thunnissen, F. B. (1998). Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *157*(6 Pt 1), 2000-2006. https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.6.9707011

Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, *33*(5), 657-670. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011

Breeze, R. G., & Wheeldon, E. B. (1977). The cells of the pulmonary airways. *The American Review of Respiratory Disease*, *116*(4), 705-777. https://doi.org/10.1164/arrd.1977.116.4.705

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5663), 1532-1535. https://doi.org/10.1126/science.1092385

Brooks, C. A., Barton, L. S., Behm, D. J., Eidam, H. S., Fox, R. M., Hammond, M., Hoang, T. H., Holt, D. A., Hilfiker, M. A., Lawhorn, B. G., Patterson, J. R., Stoy, P., Roethke, T. J., Ye, G., Zhao, S., Thorneloe, K. S., Goodman, K. B., & Cheung, M. (2019). Discovery of GSK2798745 : A Clinical Candidate for Inhibition of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4). *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *10*(8), 1228-1233. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00274

Brouillet, S., Hoffmann, P., Benharouga, M., Salomon, A., Schaal, J.-P., Feige, J.-J., & Alfaidy, N. (2010). Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis : Differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, *21*(16), 2832-2843. https://doi.org/10.1091/mbc.E10-01-0059

Brouillet, S., Hoffmann, P., Feige, J.-J., & Alfaidy, N. (2012). EG-VEGF : A key endocrine factor in placental development. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *23*(10), 501-508. https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.006

Buehler, T., Steinmann, M., Singer, F., Regamey, N., Casaulta, C., Schoeni, M. H., & Simonetti, G. D. (2012). Increased arterial stiffness in children with cystic fibrosis. *The European Respiratory Journal*, *39*(6), 1536-1537. https://doi.org/10.1183/09031936.00212511

Bullock, C. M., Li, J.-D., & Zhou, Q.-Y. (2004). Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists. *Molecular Pharmacology*, *65*(3), 582-588. https://doi.org/10.1124/mol.65.3.582

Butnariu, L. I., Ţarcă, E., Cojocaru, E., Rusu, C., Moisă, Ştefana M., Leon Constantin, M.-M., Gorduza, E. V., & Trandafir, L. M. (2021). Genetic Modifying Factors of Cystic Fibrosis Phenotype : A Challenge for Modern Medicine. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(24), 5821. https://doi.org/10.3390/jcm10245821

Calebiro, D., Koszegi, Z., Lanoiselée, Y., Miljus, T., & O'Brien, S. (2021). G protein-coupled receptor-G protein interactions : A single-molecule perspective. *Physiological Reviews*, *101*(3), 857-906. https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2020

Campódonico, V. L., Gadjeva, M., Paradis-Bleau, C., Uluer, A., & Pier, G. B. (2008). Airway epithelial control of Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. *Trends in molecular medicine*, *14*(3), 120-133. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.01.002

Cannon, C. L., Kowalski, M. P., Stopak, K. S., & Pier, G. B. (2003). Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *29*(2), 188-197. https://doi.org/10.1165/rcmb.4898

Carlos, T. M., & Harlan, J. M. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, *84*(7), 2068-2101.

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, *9*(6), 653-660. https://doi.org/10.1038/nm0603-653

Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, *69 Suppl 3*, 4-10. https://doi.org/10.1159/000088478

Casella, I., & Ambrosio, C. (2021). Prokineticin receptors interact unselectively with several G protein subtypes but bind selectively to ß-arrestin 2. *Cellular Signalling*, *83*, 110000. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110000

Catalano, R. D., Lannagan, T. R. M., Gorowiec, M., Denison, F. C., Norman, J. E., & Jabbour, H. N. (2010). Prokineticins : Novel mediators of inflammatory and contractile pathways at parturition? *Molecular Human Reproduction*, *16*(5), 311-319. https://doi.org/10.1093/molehr/gaq014

Cavaillès, A., Pinot, D., Nieves, A., Botturi, K., Lorec, A.-M., Vervloet, D., Lara, M. T. de, & Magnan, A. (2008). Exacerbations dans l'asthme : Définitions et immunopathologie. *La Presse Médicale*, *37*(1, Part 2), 136-142. https://doi.org/10.1016/j.lpm.2007.08.009

Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2 Suppl 2), S3-23. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980

Chauvet, S., Traboulsi, W., Thevenon, L., Kouadri, A., Feige, J.-J., Camara, B., Alfaidy, N., & Benharouga, M. (2015). EG-VEGF, BV8, and their receptor expression in human bronchi and their modification in cystic fibrosis : Impact of CFTR mutation (delF508). *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *309*(3), L314-322. https://doi.org/10.1152/ajplung.00382.2014

Chen, C. P., Posy, S., Ben-Shaul, A., Shapiro, L., & Honig, B. H. (2005). Specificity of cell-cell adhesion by classical cadherins : Critical role for low-affinity dimerization through beta-strand swapping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(24), 8531-8536. https://doi.org/10.1073/pnas.0503319102

Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, *9*(6), 7204-7218. https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208

Cheng, M. Y., Bullock, C. M., Li, C., Lee, A. G., Bermak, J. C., Belluzzi, J., Weaver, D. R., Leslie, F. M., & Zhou, Q.-Y. (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, *417*(6887), 405-410. https://doi.org/10.1038/417405a

Cheng, M. Y., LESLIE, F. M., & ZHOU, Q.-Y. (2006). Expression of Prokineticins and

Their Receptors in the Adult Mouse Brain. *The Journal of comparative neurology*, *498*(6), 796-809. https://doi.org/10.1002/cne.21087

Chillón, M., Casals, T., Mercier, B., Bassas, L., Lissens, W., Silber, S., Romey, M. C., Ruiz-Romero, J., Verlingue, C., & Claustres, M. (1995). Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *The New England Journal of Medicine*, *332*(22), 1475-1480. https://doi.org/10.1056/NEJM199506013322204

Cho, C., Nguyen, A., Bryant, K. J., O'Neill, S. G., & McNeil, H. P. (2016). Prostaglandin D2 metabolites as a biomarker of in vivo mast cell activation in systemic mastocytosis and rheumatoid arthritis. *Immunity, Inflammation and Disease*, *4*(1), 64-69. https://doi.org/10.1002/iid3.94

Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M., & Stern, D. M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, *91*(10), 3527-3561.

Cleaver, O., & Melton, D. A. (2003). Endothelial signaling during development. *Nature Medicine*, *9*(6), 661-668. https://doi.org/10.1038/nm0603-661

Cong, X., & Kong, W. (2020). Endothelial tight junctions and their regulatory signaling pathways in vascular homeostasis and disease. *Cellular Signalling*, *66*, 109485. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109485

Cozens, A. L., Yezzi, M. J., Kunzelmann, K., Ohrui, T., Chin, L., Eng, K., Finkbeiner, W. E., Widdicombe, J. H., & Gruenert, D. C. (1994). CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *10*(1), 38-47. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.10.1.7507342

Csanády, L., Chan, K. W., Seto-Young, D., Kopsco, D. C., Nairn, A. C., & Gadsby, D. C. (2000). Severed channels probe regulation of gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by its cytoplasmic domains. *The Journal of General Physiology*, *116*(3), 477-500. https://doi.org/10.1085/jgp.116.3.477

Cui, A., Huang, T., Li, S., Ma, A., Pérez, J. L., Sander, C., Keskin, D. B., Wu, C. J., Fraenkel, E., & Hacohen, N. (2024). Dictionary of immune responses to cytokines at single-cell resolution. *Nature*, *625*(7994), 377-384. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06816-9

Cuppens, H., & Cassiman, J.-J. (2004). CFTR mutations and polymorphisms in male infertility. *International Journal of Andrology*, *27*(5), 251-256. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2004.00485.x

Davidson, S. M., & Duchen, M. R. (2007). Endothelial mitochondria : Contributing to vascular function and disease. *Circulation Research*, *100*(8), 1128-1141. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000261970.18328.1d

Davies, P. F. (1995). Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiological Reviews*, *75*(3), 519-560. https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.3.519

Davis, C. W., & Dickey, B. F. (2008). Regulated airway goblet cell mucin secretion. *Annual Review of Physiology*, *70*, 487-512. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100638

Davis, C. W., & Lazarowski, E. (2008). Coupling of airway ciliary activity and mucin secretion to mechanical stresses by purinergic signaling. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, *163*(1-3), 208-213. https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.05.015

De Rose, V., Oliva, A., Messore, B., Grosso, B., Mollar, C., & Pozzi, E. (1998). Circulating adhesion molecules in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *157*(4 Pt 1), 1234-1239. https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.4.9704134

Dean, M., Rzhetsky, A., & Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, *11*(7), 1156-1166. https://doi.org/10.1101/gr.184901

Declercq, M., de Zeeuw, P., Conchinha, N., Geldhof, V., Ramalho, A., García-Caballero, M., Brepoels, K., Ensinck, M., Carlon, M., Bird, M., Vinckier, S., Proesmans, M., Vermeulen, F., Dupont, L., Ghesquiere, B., Dewerchin, M., Carmeliet, P., Cassiman, D., TREPS, L., & Witters, P. (2020). Transcriptomic analysis of CFTR-impaired endothelial cells reveals a pro-inflammatory phenotype. *European Respiratory Journal*, *57*, 2000261. https://doi.org/10.1183/13993003.00261-2020

Dejana, E. (2004). Endothelial cell-cell junctions : Happy together. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *5*(4), 261-270. https://doi.org/10.1038/nrm1357

Demaret, J. (2016). *Altérations des polynucléaires neutrophiles au cours des états septiques sévères* [Phdthesis, Université de Lyon]. https://theses.hal.science/tel-01476344

Demaret, J., Venet, F., Friggeri, A., Cazalis, M.-A., Plassais, J., Jallades, L., Malcus, C., Poitevin-Later, F., Textoris, J., Lepape, A., & Monneret, G. (2015). Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *Journal of Leukocyte Biology*, *98*(6), 1081-1090. https://doi.org/10.1189/jlb.4A0415-168RR

de Souza, D. a. S., Faucz, F. R., Pereira-Ferrari, L., Sotomaior, V. S., & Raskin, S. (2018). Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis : Reproductive implications and genetic counseling. *Andrology*, *6*(1), 127-135. https://doi.org/10.1111/andr.12450

Di Sant'agnese, P. A., Darling, R. C., Perera, G. A., & Shea, E. (1953). Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics*, *12*(5), 549-563.

Dickinson, K. M., & Collaco, J. M. (2021). Cystic Fibrosis. *Pediatrics in Review*, *42*(2), 55-67. https://doi.org/10.1542/pir.2019-0212

Dorsch, M., Qiu, Y., Soler, D., Frank, N., Duong, T., Goodearl, A., O'Neil, S., Lora, J., & Fraser, C. C. (2005). PK1/EG-VEGF induces monocyte differentiation and activation. *Journal of Leukocyte Biology*, *78*(2), 426-434. https://doi.org/10.1189/jlb.0205061

Downey, D. G., Bell, S. C., & Elborn, J. S. (2009). Neutrophils in cystic fibrosis. *Thorax*, *64*(1), 81-88. https://doi.org/10.1136/thx.2007.082388

Dri, E., Lampas, E., Lazaros, G., Lazarou, E., Theofilis, P., Tsioufis, C., & Tousoulis, D. (2023). Inflammatory Mediators of Endothelial Dysfunction. *Life (Basel, Switzerland)*, *13*(6), 1420. https://doi.org/10.3390/life13061420

Drifte, G., Dunn-Siegrist, I., Tissières, P., & Pugin, J. (2013). Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Critical Care Medicine*, *41*(3), 820-832. https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318274647d

Dubois, C. (2019). *Confirmation de biomarqueurs pour le pronostic du sepsis et développement de tests rapides*.

Dumur, V., Gervais, R., Rigot, J. M., Delomel-Vinner, E., Decaestecker, B., Lafitte, J. J., & Roussel, P. (1996). Congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) and cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) : Correlation between genotype and phenotype. *Human Genetics*, *97*(1), 7-10. https://doi.org/10.1007/BF00218824

Engelhardt, J. F., Yankaskas, J. R., Ernst, S. A., Yang, Y., Marino, C. R., Boucher, R. C., Cohn, J. A., & Wilson, J. M. (1992). Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nature Genetics*, *2*(3), 240-248. https://doi.org/10.1038/ng1192-240

Erfinanda, L., Zou, L., Gutbier, B., Kneller, L., Weidenfeld, S., Michalick, L., Lei, D., Reppe, K., Teixeira Alves, L. G., Schneider, B., Zhang, Q., Li, C., Fatykhova, D., Schneider, P., Liedtke, W., Sohara, E., Mitchell, T. J., Gruber, A. D., Hocke, A., … Kuebler, W. M. (2022). Loss of endothelial CFTR drives barrier failure and edema formation in lung infection and can be targeted by CFTR potentiation. *Science Translational Medicine*, *14*(674), eabg8577. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abg8577

Evans, M. J., Cox, R. A., Shami, S. G., Wilson, B., & Plopper, C. G. (1989). The role of basal cells in attachment of columnar cells to the basal lamina of the trachea. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *1*(6), 463-469. https://doi.org/10.1165/ajrcmb/1.6.463

Farber, S. (1943). Pancreatic Insufficiency and the Celiac Syndrome. *New England Journal of Medicine*, *229*(18), 682-687. https://doi.org/10.1056/NEJM194310282291804

Farinha, C., & Canato, S. (2017). From the endoplasmic reticulum to the plasma membrane : Mechanisms of CFTR folding and trafficking. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2387-7

Fehrenbach, H. (2001). Alveolar epithelial type II cell : Defender of the alveolus revisited. *Respiratory Research*, *2*(1), 33-46. https://doi.org/10.1186/rr36

Férec, C. (2021). [Cystic fibrosis : From gene discovery to precision medicine]. *Medecine Sciences: M/S*, *37*(6-7), 618-624. https://doi.org/10.1051/medsci/2021085

Ferrara, N., Gerber, H.-P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, *9*(6), 669-676. https://doi.org/10.1038/nm0603-669

Fiedorczuk, K., & Chen, J. (2022). Mechanism of CFTR correction by type I folding correctors. *Cell*, *185*(1), 158-168.e11. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.009

Flume, P. A. (2009). Pulmonary complications of cystic fibrosis. *Respiratory Care*, *54*(5),

618-627. https://doi.org/10.4187/aarc0443

Flume, P. A., Strange, C., Ye, X., Ebeling, M., Hulsey, T., & Clark, L. L. (2005). Pneumothorax in cystic fibrosis. *Chest*, *128*(2), 720-728. https://doi.org/10.1378/chest.128.2.720

Folkman, J. (2007). Angiogenesis : An organizing principle for drug discovery? *Nature Reviews. Drug Discovery*, *6*(4), 273-286. https://doi.org/10.1038/nrd2115

Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A., & Sessa, W. C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, *399*(6736), 597-601. https://doi.org/10.1038/21218

Galli, S. J., Tsai, M., & Piliponsky, A. M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature*, *454*(7203), 445-454. https://doi.org/10.1038/nature07204

Gasser, A., Brogi, S., Urayama, K., Nishi, T., Kurose, H., Tafi, A., Ribeiro, N., Désaubry, L., & Nebigil, C. G. (2015). Discovery and cardioprotective effects of the first non-Peptide agonists of the G protein-coupled prokineticin receptor-1. *PloS One*, *10*(4), e0121027. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121027

Gavard, J., & Gutkind, J. S. (2008). Protein Kinase C-related Kinase and ROCK Are Required for Thrombin-induced Endothelial Cell Permeability Downstream from G{alpha}12/13 and G{alpha}11/q. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(44), 29888-29896. https://doi.org/10.1074/jbc.M803880200

Ge, N., Muise, C. N., Gong, X., & Linsdell, P. (2004). Direct comparison of the functional roles played by different transmembrane regions in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(53), 55283-55289. https://doi.org/10.1074/jbc.M411935200

Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A.,

Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., & Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology*, *161*(6), 1163-1177. https://doi.org/10.1083/jcb.200302047

Ghelani, D. P., & Schneider-Futschik, E. K. (2020). Emerging Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Modulators as New Drugs for Cystic Fibrosis : A Portrait of in Vitro Pharmacology and Clinical Translation. *ACS Pharmacology & Translational Science*, *3*(1), 4-10. https://doi.org/10.1021/acsptsci.9b00060

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

Giordano, P., Leonetti, G., Granberg, V., Casolino, R. M. P., Lassandro, G., Delvecchio, M., & Linguiti, G. (2025). Effect of CFTR modulators on glucose homeostasis in children and young adults with cystic fibrosis-related diabetes : A systematic review. *Frontiers in Endocrinology*, *16*, 1623654. https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1623654

Goerke, J. (1998). Pulmonary surfactant : Functions and molecular composition. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1408*(2-3), 79-89. https://doi.org/10.1016/s0925-4439(98)00060-x

Goetz, D. M., & Savant, A. P. (2021). Review of CFTR modulators 2020. *Pediatric Pulmonology*, *56*(12), 3595-3606. https://doi.org/10.1002/ppul.25627

Gosalia, N., & Harris, A. (2015). Chromatin Dynamics in the Regulation of CFTR Expression. *Genes*, *6*(3), 543-558. https://doi.org/10.3390/genes6030543

Gouel-Chéron, A., Allaouchiche, B., Guignant, C., Davin, F., Floccard, B., Monneret, G., & AzuRea Group. (2012). Early interleukin-6 and slope of monocyte human leukocyte antigen-DR : A powerful association to predict the development of

sepsis after major trauma. *PloS One*, *7*(3), e33095. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033095

Goyal, N., Skrdla, P., Schroyer, R., Kumar, S., Fernando, D., Oughton, A., Norton, N., Sprecher, D. L., & Cheriyan, J. (2019). Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of a Novel, First-in-Class TRPV4 Ion Channel Inhibitor, GSK2798745, in Healthy and Heart Failure Subjects. *American Journal of Cardiovascular Drugs: Drugs, Devices, and Other Interventions*, *19*(3), 335-342. https://doi.org/10.1007/s40256-018-00320-6

Guérin, E., Orabona, M., Raquil, M.-A., Giraudeau, B., Bellier, R., Gibot, S., Béné, M.-C., Lacombe, F., Droin, N., Solary, E., Vignon, P., Feuillard, J., & François, B. (2014). Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration*. *Critical Care Medicine*, *42*(9), 2007-2018. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000344

Guilini, C., Urayama, K., Turkeri, G., Dedeoglu, D. B., Kurose, H., Messaddeq, N., & Nebigil, C. G. (2010). Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells : Angiogenesis and fenestration. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *298*(3), H844-852. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00898.2009

Guo, Y., Su, M., McNutt, M. A., & Gu, J. (2009). Expression and distribution of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in neurons of the human brain. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, *57*(12), 1113-1120. https://doi.org/10.1369/jhc.2009.953455

Haardt, M., Benharouga, M., Lechardeur, D., Kartner, N., & Lukacs, G. L. (1999). C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *The Journal*

of Biological Chemistry, *274*(31), 21873-21877. https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21873

Hahn, C., & Schwartz, M. A. (2009). Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *10*(1), 53-62. https://doi.org/10.1038/nrm2596

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer : The next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Harhaj, N. S., & Antonetti, D. A. (2004). Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *36*(7), 1206-1237. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.08.007

Harris, A. (1992). Cystic fibrosis gene. *British Medical Bulletin*, *48*(4), 738-753. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072575

Hattrup, C. L., & Gendler, S. J. (2008). Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annual Review of Physiology*, *70*, 431-457. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659

Heijerman, H. G. M., McKone, E. F., Downey, D. G., Van Braeckel, E., Rowe, S. M., Tullis, E., Mall, M. A., Welter, J. J., Ramsey, B. W., McKee, C. M., Marigowda, G., Moskowitz, S. M., Waltz, D., Sosnay, P. R., Simard, C., Ahluwalia, N., Xuan, F., Zhang, Y., Taylor-Cousar, J. L., … Majoor, C. (2019). Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the *F508del* mutation : A double-blind, randomised, phase 3 trial. *The Lancet*, *394*(10212), 1940-1948. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32597-8

Hellström, M., Gerhardt, H., Kalén, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H., & Betsholtz, C. (2001). Lack of Pericytes Leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis. *Journal of Cell Biology*, *153*(3), 543-554.

https://doi.org/10.1083/jcb.153.3.543

Hellström, M., Phng, L.-K., & Gerhardt, H. (2007). VEGF and Notch signaling : The yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell Adhesion & Migration*, *1*(3), 133-136. https://doi.org/10.4161/cam.1.3.4978

Hellwig-Bürgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., & Jelkmann, W. (1999). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*, *94*(5), 1561-1567.

Helms, H. C., Abbott, N. J., Burek, M., Cecchelli, R., Couraud, P.-O., Deli, M. A., Förster, C., Galla, H. J., Romero, I. A., Shusta, E. V., Stebbins, M. J., Vandenhaute, E., Weksler, B., & Brodin, B. (2016). In vitro models of the blood-brain barrier : An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *36*(5), 862-890. https://doi.org/10.1177/0271678X16630991

Highsmith, W. E., Burch, L. H., Zhou, Z., Olsen, J. C., Boat, T. E., Spock, A., Gorvoy, J. D., Quittel, L., Friedman, K. J., & Silverman, L. M. (1994). A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *The New England Journal of Medicine*, *331*(15), 974-980. https://doi.org/10.1056/NEJM199410133311503

Hilger, D., Masureel, M., & Kobilka, B. K. (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural & Molecular Biology*, *25*(1), 4-12. https://doi.org/10.1038/s41594-017-0011-7

Hisert, K. B., Heltshe, S. L., Pope, C., Jorth, P., Wu, X., Edwards, R. M., Radey, M., Accurso, F. J., Wolter, D. J., Cooke, G., Adam, R. J., Carter, S., Grogan, B., Launspach, J. L., Donnelly, S. C., Gallagher, C. G., Bruce, J. E., Stoltz, D. A., Welsh, M. J., … Singh, P. K. (2017). Restoring Cystic Fibrosis Transmembrane

Conductance Regulator Function Reduces Airway Bacteria and Inflammation in People with Cystic Fibrosis and Chronic Lung Infections. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *195*(12), 1617-1628. https://doi.org/10.1164/rccm.201609-1954OC

Hoffmann, P., Feige, J.-J., & Alfaidy, N. (2006). Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. *Endocrinology*, *147*(4), 1675-1684. https://doi.org/10.1210/en.2005-0912

Hong, K. U., Reynolds, S. D., Giangreco, A., Hurley, C. M., & Stripp, B. R. (2001). Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *24*(6), 671-681. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.24.6.4498

Http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html. (s. d.). Consulté 29 juillet 2025, à l'adresse http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html

Huang, S., Dudez, T., Scerri, I., Thomas, M. A., Giepmans, B. N. G., Suter, S., & Chanson, M. (2003). Defective activation of c-Src in cystic fibrosis airway epithelial cells results in loss of tumor necrosis factor-alpha-induced gap junction regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(10), 8326-8332. https://doi.org/10.1074/jbc.M208264200

Humlicek, A. L., Manzel, L. J., Chin, C. L., Shi, L., Excoffon, K. J. D. A., Winter, M. C., Shasby, D. M., & Look, D. C. (2007). Paracellular permeability restricts airway epithelial responses to selectively allow activation by mediators at the basolateral surface. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *178*(10), 6395-6403. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6395

Huveneers, S., Oldenburg, J., Spanjaard, E., van der Krogt, G., Grigoriev, I.,

Akhmanova, A., Rehmann, H., & de Rooij, J. (2012). Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling. *The Journal of Cell Biology*, *196*(5), 641-652. https://doi.org/10.1083/jcb.201108120

Hwang, T.-C., & Kirk, K. L. (2013). The CFTR ion channel : Gating, regulation, and anion permeation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *3*(1), a009498. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009498

Ito, H., Noda, K., Yoshida, K., Otani, K., Yoshiga, M., Oto, Y., Saito, S., & Kurosaka, D. (2016). Prokineticin 2 antagonist, PKRA7 suppresses arthritis in mice with collagen-induced arthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, *17*(1), 387. https://doi.org/10.1186/s12891-016-1243-0

Jain, R. K. (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy : A new paradigm for combination therapy. *Nature Medicine*, *7*(9), 987-989. https://doi.org/10.1038/nm0901-987

Janeway, C. A. (2001). How the immune system protects the host from infection. *Microbes and Infection*, *3*(13), 1167-1171. https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01477-0

Joubert, F. J., & Strydom, D. J. (1980). Snake venom. The amino acid sequence of protein A from Dendroaspis polylepis polylepis (black mamba) venom. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie*, *361*(12), 1787-1794. https://doi.org/10.1515/bchm2.1980.361.2.1787

Kaser, A., Winklmayr, M., Lepperdinger, G., & Kreil, G. (2003). The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Reports*, *4*(5), 469-473. https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor830

Kerem, E. (2006). Mutation specific therapy in CF. *Paediatric Respiratory Reviews*, *7 Suppl 1*, S166-169. https://doi.org/10.1016/j.prrv.2006.04.213

Kesimer, M., Ehre, C., Burns, K. A., Davis, C. W., Sheehan, J. K., & Pickles, R. J. (2013).

Molecular organization of the mucins and glycocalyx underlying mucus transport over mucosal surfaces of the airways. *Mucosal Immunology*, *6*(2), 379-392. https://doi.org/10.1038/mi.2012.81

Khalaf, M., Scott-Ward, T., Causer, A., Saynor, Z., Shepherd, A., Górecki, D., Lewis, A., Laight, D., & Shute, J. (2020). Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) in Human Lung Microvascular Endothelial Cells Controls Oxidative Stress, Reactive Oxygen-Mediated Cell Signaling and Inflammatory Responses. *Frontiers in Physiology*, *11*, 879. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00879

Khan, S. M., Sleno, R., Gora, S., Zylbergold, P., Laverdure, J.-P., Labbé, J.-C., Miller, G. J., & Hébert, T. E. (2013). The expanding roles of Gβγ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacological Reviews*, *65*(2), 545-577. https://doi.org/10.1124/pr.111.005603

Kim, S. A., Tai, C.-Y., Mok, L.-P., Mosser, E. A., & Schuman, E. M. (2011). Calcium-dependent dynamics of cadherin interactions at cell-cell junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(24), 9857-9862. https://doi.org/10.1073/pnas.1019003108

Kirby, E. F., Heard, A. S., & Wang, X. R. (2013). Enhancing the Potency of F508del Correction : A Multi-Layer Combinational Approach to Drug Discovery for Cystic Fibrosis. *Journal of Pharmacology and Clinical Toxicology*, *1*(1), Article 1. https://doi.org/10.47739/1007

Kisliouk, T., Podlovni, H., Spanel-Borowski, K., Ovadia, O., Zhou, Q.-Y., & Meidan, R. (2005). Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary : Expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. *Endocrinology*, *146*(9), 3950-3958. https://doi.org/10.1210/en.2005-0297

Klosterhalfen, B., Töns, C., Hauptmann, S., Tietze, L., Offner, F. A., Küpper, W., & Kirkpatrick, C. J. (1996). Influence of heat shock protein 70 and metallothionein induction by zinc-bis-(DL-hydrogenaspartate) on the release of inflammatory mediators in a porcine model of recurrent endotoxemia. *Biochemical Pharmacology*, *52*(8), 1201-1210. https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00469-8

Knight, D. A., & Holgate, S. T. (2003). The airway epithelium : Structural and functional properties in health and disease. *Respirology (Carlton, Vic.)*, *8*(4), 432-446. https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00493.x

Komarova, Y., & Malik, A. B. (2010). Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annual Review of Physiology*, *72*, 463-493. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135833

Korhonen, E. A., Lampinen, A., Giri, H., Anisimov, A., Kim, M., Allen, B., Fang, S., D'Amico, G., Sipilä, T. J., Lohela, M., Strandin, T., Vaheri, A., Ylä-Herttuala, S., Koh, G. Y., McDonald, D. M., Alitalo, K., & Saharinen, P. (2016). Tie1 controls angiopoietin function in vascular remodeling and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(9), 3495-3510. https://doi.org/10.1172/JCI84923

Kowalczyk, A. P., & Green, K. J. (2013). Structure, function, and regulation of desmosomes. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *116*, 95-118. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4

Kuo, W., de Bruijne, M., Petersen, J., Nasserinejad, K., Ozturk, H., Chen, Y., Perez-Rovira, A., & Tiddens, H. A. W. M. (2017). Diagnosis of bronchiectasis and airway wall thickening in children with cystic fibrosis : Objective airway-artery quantification. *European Radiology*, *27*(11), 4680-4689. https://doi.org/10.1007/s00330-017-4819-7

Lamalice, L., Le Boeuf, F., & Huot, J. (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation Research*, *100*(6), 782-794.

https://doi.org/10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e

Lattanzi, R., Casella, I., Fullone, M. R., Maftei, D., Vincenzi, M., & Miele, R. (2024). MRAP2 Inhibits β-Arrestin-2 Recruitment to the Prokineticin Receptor 2. *Current Issues in Molecular Biology*, *46*(2), 1607-1620. https://doi.org/10.3390/cimb46020104

Lattanzi, R., Maftei, D., Negri, L., Fusco, I., & Miele, R. (2018). PK2β ligand, a splice variant of prokineticin 2, is able to modulate and drive signaling through PKR1 receptor. *Neuropeptides*, *71*, 32-42. https://doi.org/10.1016/j.npep.2018.06.005

Lattanzi, R., & Miele, R. (2021). Versatile Role of Prokineticins and Prokineticin Receptors in Neuroinflammation. *Biomedicines*, *9*(11), 1648. https://doi.org/10.3390/biomedicines9111648

Lattanzi, R., Severini, C., & Miele, R. (2022). Prokineticin 2 in cancer-related inflammation. *Cancer Letters*, *546*, 215838. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215838

Lawler, J. (2002). Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *6*(1), 1-12. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2002.tb00307.x

LeCouter, J., & Ferrara, N. (2003). EG-VEGF and Bv8. A novel family of tissue-selective mediators of angiogenesis, endothelial phenotype, and function. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *13*(7), 276-282. https://doi.org/10.1016/s1050-1738(03)00110-5

LeCouter, J., Kowalski, J., Foster, J., Hass, P., Zhang, Z., Dillard-Telm, L., Frantz, G., Rangell, L., DeGuzman, L., Keller, G.-A., Peale, F., Gurney, A., Hillan, K. J., & Ferrara, N. (2001). Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature*, *412*(6850), Article 6850. https://doi.org/10.1038/35091000

Lee, A., Chow, D., Haus, B., Tseng, W., Evans, D., Fleiszig, S., Chandy, G., & Machen, T. (1999). Airway epithelial tight junctions and binding and cytotoxicity of Pseudomonas aeruginosa. *The American Journal of Physiology*, *277*(1), L204-217. https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.277.1.L204

Leeuwen, L., Fitzgerald, D. A., & Gaskin, K. J. (2014). Liver disease in cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews*, *15*(1), 69-74. https://doi.org/10.1016/j.prrv.2013.05.001

Lehr, S., Kotzka, J., Herkner, A., Sikmann, A., Meyer, H. E., Krone, W., & Müller-Wieland, D. (2000). Identification of major tyrosine phosphorylation sites in the human insulin receptor substrate Gab-1 by insulin receptor kinase in vitro. *Biochemistry*, *39*(35), 10898-10907. https://doi.org/10.1021/bi000982k

LeSimple, P., Liao, J., Robert, R., Gruenert, D. C., & Hanrahan, J. W. (2010). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking modulates the barrier function of airway epithelial cell monolayers. *The Journal of Physiology*, *588*(Pt 8), 1195-1209. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.182246

Li, M., Bullock, C. M., Knauer, D. J., Ehlert, F. J., & Zhou, Q. Y. (2001a). Identification of two prokineticin cDNAs : Recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Molecular Pharmacology*, *59*(4), 692-698. https://doi.org/10.1124/mol.59.4.692

Li, M., Bullock, C. M., Knauer, D. J., Ehlert, F. J., & Zhou, Q. Y. (2001b). Identification of two prokineticin cDNAs : Recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Molecular Pharmacology*, *59*(4), 692-698. https://doi.org/10.1124/mol.59.4.692

Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, *473*(7347), 317-325. https://doi.org/10.1038/nature10146

Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, *105*(9), 1135-1143. https://doi.org/10.1161/hc0902.104353

Liehn, E. A., & Cabrera-Fuentes, H. A. (2015). Inflammation between defense and disease : Impact on tissue repair and chronic sickness. *Discoveries*, *3*(1), e42. https://doi.org/10.15190/d.2015.34

Lin, D. C.-H., Bullock, C. M., Ehlert, F. J., Chen, J.-L., Tian, H., & Zhou, Q.-Y. (2002a). Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(22), 19276-19280. https://doi.org/10.1074/jbc.M202139200

Lin, D. C.-H., Bullock, C. M., Ehlert, F. J., Chen, J.-L., Tian, H., & Zhou, Q.-Y. (2002b). Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(22), 19276-19280. https://doi.org/10.1074/jbc.M202139200

Linsdell, P. (2006). Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Experimental Physiology*, *91*(1), 123-129. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2005.031757

Liu, F., Zhang, Z., Csanády, L., Gadsby, D. C., & Chen, J. (2017). Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel. *Cell*, *169*(1), 85-95.e8. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.024

Liu, F., Zhang, Z., Levit, A., Levring, J., Touhara, K. K., Shoichet, B. K., & Chen, J. (2019). Structural identification of a hotspot on CFTR for potentiation. *Science*, *364*(6446), 1184-1188. https://doi.org/10.1126/science.aaw7611

Lopes-Pacheco, M. (2016). CFTR Modulators : Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, *7*, 275.

https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00275

Ludovico, A., & Baroni, D. (2025). CFTR Modulators Counteract F508del CFTR Functional Defects in a Pancreatic Epithelial Model of Cystic Fibrosis. *Life (Basel, Switzerland)*, *15*(8), 1315. https://doi.org/10.3390/life15081315

Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L., & Lefkowitz, R. J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(5), 2449-2454. https://doi.org/10.1073/pnas.041604898

Madácsy, T., Pallagi, P., & Maleth, J. (2018). Cystic Fibrosis of the Pancreas : The Role of CFTR Channel in the Regulation of Intracellular Ca2+ Signaling and Mitochondrial Function in the Exocrine Pancreas. *Frontiers in Physiology*, *9*, 1585. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01585

Magnani, F., & Mattevi, A. (2019). Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, *59*, 91-97. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.001

Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N., & Yancopoulos, G. D. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, *277*(5322), 55-60. https://doi.org/10.1126/science.277.5322.55

Martucci, C., Franchi, S., Giannini, E., Tian, H., Melchiorri, P., Negri, L., & Sacerdote, P. (2006). Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, induces a proinflammatory phenotype of mouse macrophages. *British Journal of Pharmacology*, *147*(2), 225-234. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706467

Masuda, Y., Takatsu, Y., Terao, Y., Kumano, S., Ishibashi, Y., Suenaga, M., Abe, M.,

Fukusumi, S., Watanabe, T., Shintani, Y., Yamada, T., Hinuma, S., Inatomi, N., Ohtaki, T., Onda, H., & Fujino, M. (2002). Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *293*(1), 396-402. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00239-5

Maurice, M. M., & Angers, S. (2025). Mechanistic insights into Wnt–β-catenin pathway activation and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *26*(5), 371-388. https://doi.org/10.1038/s41580-024-00823-y

McMahon, S., Charbonneau, M., Grandmont, S., Richard, D. E., & Dubois, C. M. (2006). Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(34), 24171-24181. https://doi.org/10.1074/jbc.M604507200

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, *454*(7203), 428-435. https://doi.org/10.1038/nature07201

Mercer, R. R., Russell, M. L., Roggli, V. L., & Crapo, J. D. (1994). Cell number and distribution in human and rat airways. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *10*(6), 613-624. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.10.6.8003339

Middleton, P. G., Mall, M. A., Dřevínek, P., Lands, L. C., McKone, E. F., Polineni, D., Ramsey, B. W., Taylor-Cousar, J. L., Tullis, E., Vermeulen, F., Marigowda, G., McKee, C. M., Moskowitz, S. M., Nair, N., Savage, J., Simard, C., Tian, S., Waltz, D., Xuan, F., … Jain, R. (2019). Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *New England Journal of Medicine*, *381*(19), 1809-1819. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908639

Molinski, S., Eckford, P. D., Pasyk, S., Ahmadi, S., Chin, S., & Bear, C. E. (2012). Functional Rescue of F508del-CFTR Using Small Molecule Correctors. *Frontiers in Pharmacology*, *3*. https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00160

Monnier, J., & Samson, M. (2008). Cytokine properties of prokineticins. *The FEBS Journal*, *275*(16), 4014-4021. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06559.x

Monnier, J., & Samson, M. (2010). Prokineticins in angiogenesis and cancer. *Cancer Letters*, *296*(2), 144-149. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.06.011

Montoro, D. T., Haber, A. L., Biton, M., Vinarsky, V., Lin, B., Birket, S. E., Yuan, F., Chen, S., Leung, H. M., Villoria, J., Rogel, N., Burgin, G., Tsankov, A. M., Waghray, A., Slyper, M., Waldman, J., Nguyen, L., Dionne, D., Rozenblatt-Rosen, O., … Rajagopal, J. (2018). A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature*, *560*(7718), 319-324. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0393-7

Moore, A., Amselem, S., Duriez, B., & Escudier, E. (2004). [Molecular basis of the primary ciliary dyskinesias]. *Revue Des Maladies Respiratoires*, *21*(3 Pt 1), 521-526. https://doi.org/10.1016/s0761-8425(04)71356-x

Mornon, J.-P., Lehn, P., & Callebaut, I. (2009). Molecular models of the open and closed states of the whole human CFTR protein. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *66*(21), 3469-3486. https://doi.org/10.1007/s00018-009-0133-0

Moskowitz, S. M., Chmiel, J. F., Sternen, D. L., Cheng, E., Gibson, R. L., Marshall, S. G., & Cutting, G. R. (2008). Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and *CFTR*-related disorders. *Genetics in Medicine*, *10*(12), 851-868. https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31818e55a2

Müller, L., Hatzfeld, M., & Keil, R. (2021). Desmosomes as Signaling Hubs in the Regulation of Cell Behavior. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 745670. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.745670

Muller, W. A. (2011). Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annual Review of Pathology*, *6*, 323-344. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130224

Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*, *417*(1), 1-13. https://doi.org/10.1042/BJ20081386

Nagano, H., Goi, T., Koneri, K., Hirono, Y., Katayama, K., & Yamaguchi, A. (2007). Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) expression in colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*, *96*(7), 605-610. https://doi.org/10.1002/jso.20716

Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, *420*(6917), 846-852. https://doi.org/10.1038/nature01320

Negri, L., & Ferrara, N. (2018). The Prokineticins : Neuromodulators and Mediators of Inflammation and Myeloid Cell-Dependent Angiogenesis. *Physiological Reviews*, *98*(2), 1055-1082. https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2017

Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., Canestrelli, M., Nicotra, A., & Melchiorri, P. (2009). Bv8/Prokineticins and their Receptors A New Pronociceptive System. *International Review of Neurobiology*, *85*, 145-157. https://doi.org/10.1016/S0074-7742(09)85011-3

Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., De Felice, M., Colucci, A., & Melchiorri, P. (2004). Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, modulates ingestive behaviour in rats. *British Journal of Pharmacology*, *142*(1), 181-191. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705686

Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., & Melchiorri, P. (2007). Bv8/Prokineticin proteins and their receptors. *Life Sciences*, *81*(14), 1103-1116. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.08.011

New, D. C., & Wong, Y. H. (2007). Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *Journal of Molecular Signaling*, *2*, 2. https://doi.org/10.1186/1750-2187-2-2

Ng, K. L., Li, J.-D., Cheng, M. Y., Leslie, F. M., Lee, A. G., & Zhou, Q.-Y. (2005).

Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science (New York, N.Y.)*, *308*(5730), 1923-1927. https://doi.org/10.1126/science.1112103

Ngan, E. S. W., & Tam, P. K. H. (2008). Prokineticin-signaling pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *40*(9), 1679-1684. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.03.010

Nick, J. A., & Nichols, D. P. (2016). Diagnosis of Adult Patients with Cystic Fibrosis. *Clinics in Chest Medicine*, *37*(1), 47-57. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2015.11.006

Noe, J., Petrusca, D., Rush, N., Deng, P., VanDemark, M., Berdyshev, E., Gu, Y., Smith, P., Schweitzer, K., Pilewsky, J., Natarajan, V., Xu, Z., Obukhov, A. G., & Petrache, I. (2009). CFTR regulation of intracellular pH and ceramides is required for lung endothelial cell apoptosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *41*(3), 314-323. https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0264OC

Nolan, D. J., Ginsberg, M., Israely, E., Palikuqi, B., Poulos, M. G., James, D., Ding, B.-S., Schachterle, W., Liu, Y., Rosenwaks, Z., Butler, J. M., Xiang, J., Rafii, A., Shido, K., Rabbany, S. Y., Elemento, O., & Rafii, S. (2013). Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell heterogeneity in organ maintenance and regeneration. *Developmental Cell*, *26*(2), 204-219. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.017

Nozik-Grayck, E., Huang, Y.-C. T., Carraway, M. S., & Piantadosi, C. A. (2003). Bicarbonate-dependent superoxide release and pulmonary artery tone. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *285*(6), H2327-2335. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00507.2003

O'Reilly, M. S. (1997). Angiostatin : An endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS*, *79*, 273-294.

Orr, Y., Taylor, J. M., Bannon, P. G., Geczy, C., & Kritharides, L. (2005). Circulating CD10-/CD16low neutrophils provide a quantitative index of active bone marrow

neutrophil release. *British Journal of Haematology*, *131*(4), 508-519. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05794.x

Overall, C. M., & Kleifeld, O. (2006). Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy. *British Journal of Cancer*, *94*(7), 941-946. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603043

Patrick, A. E., & Thomas, P. J. (2012). Development of CFTR structure. *Frontiers in Pharmacology*, *3*. https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00162

Patrizio, P., & Salameh, W. A. (1998). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mRNA in normal and pathological adult human epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, *53*, 261-270.

Patwardhan, A., Cheng, N., & Trejo, J. (2021). Post-Translational Modifications of G Protein-Coupled Receptors Control Cellular Signaling Dynamics in Space and Time. *Pharmacological Reviews*, *73*(1), 120-151. https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000082

Pedro, M. P., Lund, K., & Iglesias-Bartolome, R. (2020). The landscape of GPCR signaling in the regulation of epidermal stem cell fate and skin homeostasis. *STEM CELLS*, *38*(12), 1520-1531. https://doi.org/10.1002/stem.3273

Petrache, I., Petrusca, D. N., Bowler, R. P., & Kamocki, K. (2011). Involvement of Ceramide in Cell Death Responses in the Pulmonary Circulation. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *8*(6), 492-496. https://doi.org/10.1513/pats.201104-034MW

Pier, G. B., Grout, M., Zaidi, T., Meluleni, G., Mueschenborn, S. S., Banting, G., Ratcliff, R., Evans, M. J., & Colledge, W. H. (1998). Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature*, *393*(6680), 79-82. https://doi.org/10.1038/30006

Pier, G. B., Grout, M., & Zaidi, T. S. (1997). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of Pseudomonas aeruginosa

from the lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(22), 12088-12093. https://doi.org/10.1073/pnas.94.22.12088

Piera-Velazquez, S., Li, Z., & Jimenez, S. A. (2011). Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *The American Journal of Pathology*, *179*(3), 1074-1080. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.06.001

Pierce, K. L., & Lefkowitz, R. J. (2001). Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews. Neuroscience*, *2*(10), 727-733. https://doi.org/10.1038/35094577

Pinsky, D. J., Naka, Y., Liao, H., Oz, M. C., Wagner, D. D., Mayadas, T. N., Johnson, R. C., Hynes, R. O., Heath, M., Lawson, C. A., & Stern, D. M. (1996). Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *The Journal of Clinical Investigation*, *97*(2), 493-500. https://doi.org/10.1172/JCI118440

Plasschaert, L. W., Žilionis, R., Choo-Wing, R., Savova, V., Knehr, J., Roma, G., Klein, A. M., & Jaffe, A. B. (2018). A single cell atlas of the tracheal epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature*, *560*(7718), 377-381. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0394-6

Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, *7*(10), 803-815. https://doi.org/10.1038/nri2171

Podlovni, H., Ovadia, O., Kisliouk, T., Klipper, E., Zhou, Q.-Y., Friedman, A., Alfaidy, N., & Meidan, R. (2006). Differential expression of prokineticin receptors by endothelial cells derived from different vascular beds : A physiological basis for distinct endothelial function. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*,

18(6), 315-326. https://doi.org/10.1159/000097609

Potente, M., Gerhardt, H., & Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, *146*(6), 873-887. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039

Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., & Rusnati, M. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *16*(2), 159-178. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.004

Puchelle, E., Zahm, J. M., & Duvivier, C. (1983). Spinability of bronchial mucus. Relationship with viscoelasticity and mucous transport properties. *Biorheology*, *20*(2), 239-249. https://doi.org/10.3233/bir-1983-20214

Ramananda, Y., Naren, A. P., & Arora, K. (2024). Functional Consequences of CFTR Interactions in Cystic Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(6), Article 6. https://doi.org/10.3390/ijms25063384

Ramsey, B. W., Davies, J., McElvaney, N. G., Tullis, E., Bell, S. C., Dřevínek, P., Griese, M., McKone, E. F., Wainwright, C. E., Konstan, M. W., Moss, R., Ratjen, F., Sermet-Gaudelus, I., Rowe, S. M., Dong, Q., Rodriguez, S., Yen, K., Ordoñez, C., & Elborn, J. S. (2011). A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation. *New England Journal of Medicine*, *365*(18), 1663-1672. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1105185

Ranganathan, S. C., Hall, G. L., Sly, P. D., Stick, S. M., & Douglas, T. A. (2017). Early Lung Disease in Infants and Preschool Children with Cystic Fibrosis. What Have We Learned and What Should We Do about It? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *195*(12), 1567-1575. https://doi.org/10.1164/rccm.201606-1107CI

Ratjen, F., Bell, S. C., Rowe, S. M., Goss, C. H., Quittner, A. L., & Bush, A. (2015). Cystic fibrosis. *Nature Reviews. Disease Primers*, *1*, 15010.

https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.10

Ray, P. D., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, *24*(5), 981-990. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008

Regard, L., Martin, C., Burnet, E., Da Silva, J., & Burgel, P.-R. (2022). CFTR Modulators in People with Cystic Fibrosis : Real-World Evidence in France. *Cells*, *11*(11), 1769. https://doi.org/10.3390/cells11111769

Reynaud, D., Sergent, F., Abi Nahed, R., Traboulsi, W., Collet, C., Marquette, C., Hoffmann, P., Balboni, G., Zhou, Q.-Y., Murthi, P., Benharouga, M., & Alfaidy, N. (2021). Evidence-Based View of Safety and Effectiveness of Prokineticin Receptors Antagonists during Pregnancy. *Biomedicines*, *9*(3), 309. https://doi.org/10.3390/biomedicines9030309

Ribatti, D., Nico, B., & Crivellato, E. (2011). The role of pericytes in angiogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, *55*(3), 261-268. https://doi.org/10.1387/ijdb.103167dr

Rich, D. P., Gregory, R. J., Anderson, M. P., Manavalan, P., Smith, A. E., & Welsh, M. J. (1991). Effect of deleting the R domain on CFTR-generated chloride channels. *Science (New York, N.Y.)*, *253*(5016), 205-207. https://doi.org/10.1126/science.1712985

Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement : A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*, *11*(9), 785-797. https://doi.org/10.1038/ni.1923

Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., & Chou, J. L. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene : Cloning and characterization of complementary DNA. *Science (New York, N.Y.)*, *245*(4922), 1066-1073. https://doi.org/10.1126/science.2475911

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, *386*(6626), 671-674. https://doi.org/10.1038/386671a0

Rodrigues, C. S., Canto, M., Torres, R., Railean, V., Ramalho, S. S., Farinha, C. M., Pankonien, I., & Amaral, M. D. (2025). CFTR ion transport deficiency primes the epithelium for partial epithelial-mesenchymal transition in cystic fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, *16*. https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1655479

Rodriguez-Miguelez, P., Thomas, J., Seigler, N., Crandall, R., McKie, K. T., Forseen, C., & Harris, R. A. (2016). Evidence of microvascular dysfunction in patients with cystic fibrosis. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *310*(11), H1479-1485. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00136.2016

Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, *459*(7245), 356-363. https://doi.org/10.1038/nature08144

Rossaint, R., Pison, U., Gerlach, H., & Falke, K. J. (1993). Inhaled nitric oxide : Its effects on pulmonary circulation and airway smooth muscle cells. *European Heart Journal*, *14 Suppl I*, 133-140.

Sabharwal, S. (2016). Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis. *Gastroenterology & Hepatology*, *12*(1), 43-47.

Saint-Criq, V., & Gray, M. A. (2017). Role of CFTR in epithelial physiology. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *74*(1), 93-115. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2391-y

Schroeder, T. H., Lee, M. M., Yacono, P. W., Cannon, C. L., Gerçeker, A. A., Golan, D. E., & Pier, G. B. (2002). CFTR is a pattern recognition molecule that extracts Pseudomonas aeruginosa LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(10), 6907-6912.

https://doi.org/10.1073/pnas.092160899

Schweitz, H., Pacaud, P., Diochot, S., Moinier, D., & Lazdunski, M. (1999). MIT(1), a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction. *FEBS Letters*, *461*(3), 183-188. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01459-3

Schwiebert, E. M., Benos, D. J., Egan, M. E., Stutts, M. J., & Guggino, W. B. (1999). CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiological Reviews*, *79*(1 Suppl), S145-166. https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.S145

Sears, P. R., Thompson, K., Knowles, M. R., & Davis, C. W. (2013). Human airway ciliary dynamics. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *304*(3), L170-183. https://doi.org/10.1152/ajplung.00105.2012

Seidelmann, S. B., Lighthouse, J. K., & Greif, D. M. (2014). Development and pathologies of the arterial wall. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *71*(11), 1977-1999. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1478-y

Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, *148*(3), 399-408. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021

Serhan, C. N., Chiang, N., & Van Dyke, T. E. (2008). Resolving inflammation : Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews. Immunology*, *8*(5), 349-361. https://doi.org/10.1038/nri2294

Serohijos, A. W. R., Hegedus, T., Aleksandrov, A. A., He, L., Cui, L., Dokholyan, N. V., & Riordan, J. R. (2008). Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(9), 3256-3261. https://doi.org/10.1073/pnas.0800254105

Sharma, M., Pampinella, F., Nemes, C., Benharouga, M., So, J., Du, K., Bache, K. G., Papsin, B., Zerangue, N., Stenmark, H., & Lukacs, G. L. (2004). Misfolding

diverts CFTR from recycling to degradation : Quality control at early endosomes. *The Journal of Cell Biology*, *164*(6), 923-933. https://doi.org/10.1083/jcb.200312018

Sheppard, D. N., Rich, D. P., Ostedgaard, L. S., Gregory, R. J., Smith, A. E., & Welsh, M. J. (1993). Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl- channels with altered pore properties. *Nature*, *362*(6416), 160-164. https://doi.org/10.1038/362160a0

Soga, T., Matsumoto, S. ichiro, Oda, T., Saito, T., Hiyama, H., Takasaki, J., Kamohara, M., Ohishi, T., Matsushime, H., & Furuichi, K. (2002). Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1579*(2-3), 173-179. https://doi.org/10.1016/s0167-4781(02)00546-8

Spina, D. (1998). Epithelium smooth muscle regulation and interactions. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *158*(5 Pt 3), S141-145. https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.supplement_2.13tac100a

Srivastava, A., Gupta, B., Gupta, C., & Shukla, A. K. (2015). Emerging Functional Divergence of ß-Arrestin Isoforms in GPCR Function. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *26*(11), 628-642. https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.09.001

St John, A. L., & Abraham, S. N. (2013). Innate Immunity and its Regulation by Mast Cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *190*(9), 4458-4463. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203420

Steines, B., Dickey, D. D., Bergen, J., Excoffon, K. J. D. A., Weinstein, J. R., Li, X., Yan, Z., Alaiwa, M. H. A., Shah, V. S., Bouzek, D. C., Powers, L. S., Gansemer, N. D., Ostedgaard, L. S., Engelhardt, J. F., Stoltz, D. A., Welsh, M. J., Sinn, P. L., Schaffer, D. V., & Zabner, J. (2016). *CFTR* gene transfer with AAV improves early cystic fibrosis pig phenotypes. *JCI Insight*, *1*(14). https://doi.org/10.1172/jci.insight.88728

Stenmark, K. R., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E., Anwar, A., Li, M., Riddle, S., & Frid, M. (2011). The adventitia : Essential role in pulmonary vascular remodeling. *Comprehensive Physiology*, *1*(1), 141-161. https://doi.org/10.1002/cphy.c090017

Stone, K. C., Mercer, R. R., Gehr, P., Stockstill, B., & Crapo, J. D. (1992). Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *6*(2), 235-243. https://doi.org/10.1165/ajrcmb/6.2.235

Strilić, B., Kucera, T., Eglinger, J., Hughes, M. R., McNagny, K. M., Tsukita, S., Dejana, E., Ferrara, N., & Lammert, E. (2009). The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta. *Developmental Cell*, *17*(4), 505-515. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.08.011

Tarran, R. (2004). Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *1*(1), 42-46. https://doi.org/10.1513/pats.2306014

ter Beek, J., Guskov, A., & Slotboom, D. J. (2014). Structural diversity of ABC transporters. *The Journal of General Physiology*, *143*(4), 419-435. https://doi.org/10.1085/jgp.201411164

Thébaud, B., & Abman, S. H. (2007). Bronchopulmonary dysplasia : Where have all the vessels gone? Roles of angiogenic growth factors in chronic lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *175*(10), 978-985. https://doi.org/10.1164/rccm.200611-1660PP

Totani, L., Plebani, R., Piccoli, A., Di Silvestre, S., Lanuti, P., Recchiuti, A., Cianci, E., Dell'Elba, G., Sacchetti, S., Patruno, S., Guarnieri, S., Mariggiò, M. A., Mari, V. C., Anile, M., Venuta, F., Del Porto, P., Moretti, P., Prioletta, M., Mucilli, F., … Romano, M. (2017). Mechanisms of endothelial cell dysfunction in cystic fibrosis. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, *1863*(12), 3243-3253.

https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.08.011

Traboulsi, W., Brouillet, S., Sergent, F., Boufettal, H., Samouh, N., Aboussaouira, T., Hoffmann, P., Feige, J. J., Benharouga, M., & Alfaidy, N. (2015). Prokineticins in central and peripheral control of human reproduction. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, *24*(2), 73-81. https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0040

Traboulsi, W., Sergent, F., Boufettal, H., Brouillet, S., Slim, R., Hoffmann, P., Benlahfid, M., Zhou, Q. Y., Balboni, G., Onnis, V., Bolze, P. A., Salomon, A., Sauthier, P., Mallet, F., Aboussaouira, T., Feige, J. J., Benharouga, M., & Alfaidy, N. (2017). Antagonism of EG-VEGF Receptors as Targeted Therapy for Choriocarcinoma Progression In Vitro and In Vivo. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *23*(22), 7130-7140. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0811

Trezise, A. E., & Buchwald, M. (1991). In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature*, *353*(6343), 434-437. https://doi.org/10.1038/353434a0

Trezise, A. E., Chambers, J. A., Wardle, C. J., Gould, S., & Harris, A. (1993). Expression of the cystic fibrosis gene in human foetal tissues. *Human Molecular Genetics*, *2*(3), 213-218. https://doi.org/10.1093/hmg/2.3.213

Tümmler, B., Pallenberg, S. T., Dittrich, A.-M., Graeber, S. Y., Naehrlich, L., Sommerburg, O., & Mall, M. A. (2025). Progress of personalized medicine of cystic fibrosis in the times of efficient CFTR modulators. *Molecular and Cellular Pediatrics*, *12*(1), 6. https://doi.org/10.1186/s40348-025-00194-0

Turner, J., Roger, J., Fitau, J., Combe, D., Giddings, J., Heeke, G. V., & Jones, C. E. (2011). Goblet cells are derived from a FOXJ1-expressing progenitor in a human airway epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*,

44(3), 276-284. https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0304OC

van Hinsbergh, V. W. M. (2012). Endothelium—Role in regulation of coagulation and inflammation. *Seminars in Immunopathology*, *34*(1), 93-106. https://doi.org/10.1007/s00281-011-0285-5

Varga, Z., Flammer, A. J., Steiger, P., Haberecker, M., Andermatt, R., Zinkernagel, A. S., Mehra, M. R., Schuepbach, R. A., Ruschitzka, F., & Moch, H. (2020). Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *The Lancet*, *395*(10234), 1417-1418. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30937-5

Veit, G., Bossard, F., Goepp, J., Verkman, A. S., Galietta, L. J. V., Hanrahan, J. W., & Lukacs, G. L. (2012). Proinflammatory cytokine secretion is suppressed by TMEM16A or CFTR channel activity in human cystic fibrosis bronchial epithelia. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(21), 4188-4202. https://doi.org/10.1091/mbc.E12-06-0424

Villate-Beitia, I., Zarate ,Jon, Puras ,Gustavo, & and Pedraz, J. L. (2017). Gene delivery to the lungs : Pulmonary gene therapy for cystic fibrosis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *43*(7), 1071-1081. https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1298122

Vincenzi, M., Kremić, A., Jouve, A., Lattanzi, R., Miele, R., Benharouga, M., Alfaidy, N., Migrenne-Li, S., Kanthasamy, A. G., Porcionatto, M., Ferrara, N., Tetko, I. V., Désaubry, L., & Nebigil, C. G. (2023). Therapeutic Potential of Targeting Prokineticin Receptors in Diseases. *Pharmacological Reviews*, *75*(6), 1167-1199. https://doi.org/10.1124/pharmrev.122.000801

Wagenvoort, C. A., & Wagenvoort, N. (1982). Smooth muscle content of pulmonary arterial media in pulmonary venous hypertension compared with other forms of pulmonary hypertension. *Chest*, *81*(5), 581-585. https://doi.org/10.1378/chest.81.5.581

Walsh, D. A., & Pearson, C. I. (2001). Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases. *Arthritis Research*, *3*(3), 147-153. https://doi.org/10.1186/ar292

Wang, S., Raab, R. W., Schatz, P. J., Guggino, W. B., & 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 Letters*, *427*(1), 103-108. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00402-5

Ward, P. A., & Hunninghake, G. W. (1998). Lung Inflammation and Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *157*(4), S123-S129. https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.4.nhlbi-10

Ware, L. B., & Matthay, M. A. (2000). The acute respiratory distress syndrome. *The New England Journal of Medicine*, *342*(18), 1334-1349. https://doi.org/10.1056/NEJM200005043421806

Wechselberger, C., Puglisi, R., Engel, E., Lepperdinger, G., Boitani, C., & Kreil, G. (1999). The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes. *FEBS Letters*, *462*(1-2), 177-181. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01473-8

Weibel, E. R. (1963). *Morphometry of the Human Lung*. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-87553-3

Wielpütz, M. O., Puderbach, M., Kopp-Schneider, A., Stahl, M., Fritzsching, E., Sommerburg, O., Ley, S., Sumkauskaite, M., Biederer, J., Kauczor, H.-U., Eichinger, M., & Mall, M. A. (2014). Magnetic resonance imaging detects changes in structure and perfusion, and response to therapy in early cystic fibrosis lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *189*(8), 956-965. https://doi.org/10.1164/rccm.201309-1659OC

Wilkens, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000prime Reports*,

7, 14. https://doi.org/10.12703/P7-14

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., & Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, *332*(6163), 411-415. https://doi.org/10.1038/332411a0

Yang, A., Yu, G., Wu, Y., & Wang, H. (2021). Role of ß2-adrenergic receptors in chronic obstructive pulmonary disease. *Life Sciences*, *265*, 118864. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118864

Zahm, J. M., Pierrot, D., Vaquez-Girod, S., Duvivier, C., King, M., & Puchelle, E. (1989). The role of mucus sol phase in clearance by simulated cough. *Biorheology*, *26*(4), 747-752. https://doi.org/10.3233/bir-1989-26407

Zahraoui, A. (2004). [Tight junctions, a platform regulating cell proliferation and polarity]. *Medecine Sciences: M/S*, *20*(5), 580-585. https://doi.org/10.1051/medsci/2004205580

Zeilhofer, H. U., & Schorr, W. (2000). Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. *Current Opinion in Hematology*, *7*(3), 178-182. https://doi.org/10.1097/00062752-200005000-00009

Zeng, M., Szymczak, M., Ahuja, M., Zheng, C., Yin, H., Swaim, W., Chiorini, J. A., Bridges, R. J., & Muallem, S. (2017). Correction of Ductal CFTR Activity Rescues Acinar Cell and Pancreatic and Salivary Gland Functions in Mouse Models of Autoimmune Disease. *Gastroenterology*, *153*(4), 1148-1159. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.06.011

Zeng, W., Lee, M. G., Yan, M., Diaz, J., Benjamin, I., Marino, C. R., Kopito, R., Freedman, S., Cotton, C., Muallem, S., & Thomas, P. (1997). Immuno and functional characterization of CFTR in submandibular and pancreatic acinar and duct cells. *The American Journal of Physiology*, *273*(2 Pt 1), C442-455.

https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.2.C442

Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 4350965. https://doi.org/10.1155/2016/4350965

Zhang, Y., Li, X., Grassmé, H., Döring, G., & Gulbins, E. (2010). Alterations in ceramide concentration and pH determine the release of reactive oxygen species by Cftr-deficient macrophages on infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *184*(9), 5104-5111. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902851

Zhou, Q.-Y. (2006). The Prokineticins : A Novel Pair of Regulatory Peptides. *Molecular interventions*, *6*(6), 330-338. https://doi.org/10.1124/mi.6.6.6

Zielenski, J., & Tsui, L. C. (1995). Cystic fibrosis : Genotypic and phenotypic variations. *Annual Review of Genetics*, *29*, 777-807. https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.004021

Zonneveld, R., Martinelli, R., Shapiro, N., Kuijpers, T., Plötz, F., & Carman, C. (2014). Soluble adhesion molecules as markers for sepsis and the potential pathophysiological discrepancy in neonates, children and adults. *Critical care (London, England)*, *18*, 204. https://doi.org/10.1186/cc13733

Annexe

Production scientifique

Curriculum vitae

Production scientifique

Publication

1. Abi Nahed R., Safwan-Zaiter H., Gemy K., **Lyko C**., Boudaud M., Desseux M., Marquette C., Barjat T., Alfaidy N. and Benharouga M. "The Multifaceted Functions of Prion Protein (PrP^C) in Cancer." ***Cancers. 2023; 15(20): 4982.***

2. **Camille Lyko**, Amal Kouadri, Johanna Cormenier, Kevin Gemy, Nadia Alfaidy, and Mohamed Benharouga. Non-Infectious Inflammatory Response in CF Airway Epithelial Cells: A Comparative Study of Modulators and Wild-Type CFTR Rescue. (***Soumis à Frontiers in Pharmacology***)

3. **Camille Lyko**, Mélanie Boudaud, Nicolas Lemaitre, Martial Delion, Johanna Cormenier, Kevin Gemy, Nadia Alfaidy, and Mohamed Benharouga. PROK1 Enhances Leukocyte Transmigration and Barrier Disruption in Pulmonary Endothelial Cells During Inflammation. (***En préparation pour soumission***)

Participation aux congrès

1) Congrès des jeunes chercheurs, VLM Février 2024 Paris présentation d'un poster

2) Journée Annuelle des Doctorants EDCSV, Grenoble, Juin 2024 présentation d'un poster

3) Journée de la recherche médical, Grenoble, Juin 2024 présentation d'un poster

4) Congrès des jeunes chercheurs, VLM Février 2025 Paris présentation oral



Camille LYKO

Doctorante en Biologie Santé – Mucoviscidose, Endothélium et Épithélium Pulmonaire

Contacts

06-31-70-35-33
camillelyko@hotmail.fr

Expérience

Depuis 2022 à 2025 Doctorat en Biologie

Directeur de thèse : Pr Benharouga Mohamed

Titre de la thèse : Altérations de la régulation inflammatoire pulmonaire dans la mucoviscidose : rôle du repliement de CFTR dans l'épithélium et de PROK1 dans l'endothélium microvasculaire

Janvier à juillet 2022: Stage Master 2 (6 mois) *Laboratoire d'Hypoxie PhysioPathologie (HP2) (INSERM)* , Grenoble, sous la tutelle du Dr Arnaud *: "**Impact de l'hypoxie intermittente sur le remodelage cardiaque post-ischémique : Rôle de l'interaction entre la signalisation insulinique et β-adrénergique cardiaque**"*

Avril à juillet 2021: Stage Master 1 (4 mois) *Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (CNRS),* Nice , sous la tutelle du Dr Bichet :" ***Identification des structures qui expriment le canal potassique THIK2***"

Janvier 2020: Stage technicien Licence 3 (1 mois) *Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (CNRS),* Nice sous la tutelle du Dr. *Bichet :"**Caractérisation globale de l'expression tissulaire de THIK2 chez la souris***"

Compétences

Technique de laboratoire

- **Western blot**
- **Immunomarquage /Coloration**
- **Microscopie**
- **Microtome / Cryostat**
- **PCR et qPCR**
- Culture cellulaire
- Sous clonage
- Transfection
- Transformation
- Chromatographie
- Dot blot
- Cytométrie en flux
- Test ELISA
- Sonde calcique
- Chambre de Ussing

Logiciels:

Pack Office; ImageJ; R studio; GraphPad Prism; BioRender; Photoshop; Oméro.

Langues

- Français (langue maternelle)
- Anglais scientifique
- Espagnol

Formations

2020-2022

Master Biologie Santé mention Physiologie, Physiopathologie et Pharmacologie a l'*Université de Poitiers*

2017-2020

Licence Sciences de la vie mention Biologie a l'*Université Grenoble Alpes*

2015-2016

Obtention du Baccalauréat Scientifique option Sciences de la vie et de la terre

Abstract (3265 caractères espaces compris)

Inflammation is a multifactorial defense process involved in numerous pathologies. Its exacerbation is a hallmark of several pulmonary diseases, particularly cystic fibrosis (CF), a genetic disorder caused by mutations in the chloride channel CFTR, most commonly F508del. This mutation leads to chronic pulmonary inflammation, often present from the early stages of the disease, independently of any infection. It is now well established that the lack of the activity of the CFTR channel generates an environment that facilitate the infiltration of neutrophils (PMNs) by transmigration across epithelial and endothelial barriers, thereby worsening the inflammatory response.

Although CFTR modulators have improved patients' quality of life by partially restoring the activity of CFTR-F508del chloride channel, their anti-inflammatory effects remain limited. This suggests the involvement of additional mechanisms in CF-related inflammation, that could be independent of CFTR transport activity. Among these mechanisms, are interactions between epithelial and endothelial cells via inflammatory and angiogenic factors.

Our team focused on PROK1 (also known as EG-VEGF), a circulating factor from the prokineticin family, and its receptors PROKR1 and PROKR2. Although dysregulation of this signaling axis has been observed in CF, its role in inflammation, infection, and the integrity of cellular barriers remains poorly understood.

My PhD project was structured around two main objectives:

(1) Characterizing the inflammatory response of bronchial epithelial cells in relation to CFTR modulators and CFTR restoration.

(2) Exploring the role of PROK1 in inflammation and the permeability of human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMECs).

First, we compared the anti-inflammatory effects of CFTR-F508del modulators to wild-type CFTR overexpression, using various bronchial cell lines (HBE, CFBE, CFBE-dF, CFBE-wt). Our results show that modulators exert only a limited effect on the inflammatory response, unlike the overexpression of wild-type CFTR. The limited response to modulators is likely due to insufficient folding and function of the CFTR-F508del protein, as confirmed by *in situ* protease resistance assays.

Next, we evaluated the response of HPMECs to inflammatory stimuli by assessing their proliferation, migration, invasion, and ability to form vascular-like structures. Our analyses demonstrate that these cells express PROKR1 and PROKR2, secrete PROK1, and display either pro- or anti-inflammatory phenotypes depending on the type of stimulus. Moreover, we demonstrated that the integrity of the endothelial barrier was impaired in the presence of inflammation, infection (LPS), or PROK1, which facilitate neutrophil transmigration. This was confirmed by transmigration assays using HL60 cells differentiated into neutrophil-like cells, which crosse the HPMEC barrier more easily under stressful conditions.

Overall, this work highlights the limited anti-inflammatory effect of CFTR modulators and reveals the involvement of PROK1 in promoting vascular permeability. A better understanding of the functioning of endothelial in pathological setting such as CF, may open new therapeutic avenue through the specific and early targeting of inflammation.

Résumé (Longue : 3460 caractères espaces compris)

L'inflammation est un processus de défense multifactoriel impliqué dans de nombreuses pathologies. Son exacerbation est une caractéristique majeure de plusieurs affections pulmonaires, notamment la mucoviscidose (MV), maladie génétique caractérisée par une mutation du canal chlorure (Cl^-) CFTR, principalement F508del. Cette mutation entraîne une inflammation pulmonaire chronique souvent présente dès les premiers stades de la maladie, indépendamment de toute infection. L'absence d'activité CFTR favoriserait un environnement propice à l'infiltration de polynucléaires neutrophiles (PN), via leur transmigration à travers les barrières épithéliales et endothéliales, aggravant la réponse inflammatoire.

Si les modulateurs de CFTR ont amélioré la qualité de vie des patients en restaurant partiellement l'activité canal du CFTR-F508del, leur effet anti-inflammatoire reste limité. Ceci suggère l'implication de mécanismes additionnels, indépendants de l'activité de transport de CFTR, dans l'inflammation associée à la MV. Parmi ces mécanismes, les interactions entre cellules épithéliales et endothéliales via des facteurs pro-inflammatoires et pro-angiogéniques pourraient jouer un rôle central.

Notre équipe s'est intéressée à PROK1 (ou EG-VEGF), un facteur circulant de la famille des prokinéticines, et à ses récepteurs PROKR1 et PROKR2. Bien que leur dérégulation ait été observée dans la MV, leur rôle dans le contexte de l'inflammation, de l'infection et de l'intégrité des barrières cellulaires reste mal compris.

Mon projet de thèse s'est articulé autour de deux axes :

(**1**) l'étude de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques en lien avec les modulateurs et la protéine CFTR.

(**2**) l'exploration du rôle de PROK1 dans l'inflammation et la perméabilité des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC).

Dans un premier temps, nous avons comparé l'effet anti-inflammatoire des modulateurs de CFTR-dF508 à la surexpression de CFTR sauvage, en utilisant différentes lignées cellulaires bronchiques (HBE, CFBE, CFBE-dF, CFBE-wt). Nos résultats montrent que les modulateurs exercent un effet limité sur la réponse inflammatoire, contrairement à la surexpression de CFTR-wt, probablement en raison d'un repliement et d'un fonctionnement insuffisants de la protéine CFTR-dF508, comme l'ont révélé des tests de résistance aux protéases *in situ*.

Dans un second temps, nous avons évalué la réponse des HPMEC aux stimuli inflammatoires, en étudiant leur prolifération, migration, invasion, et capacité à former des structures vasculaires. Nos résultats montrent que ces cellules sécrètent PROK1 et expriment PROKR1 et PROKR2. Aussi, elles adoptent un phénotype pro- ou anti-inflammatoire selon le stimulus reçu. Par ailleurs, nous avons démontré que l'intégrité de la barrière endothéliale est altérée en présence d'inflammation, de traitement au LPS ou de PROK1, favorisant la transmigration des neutrophiles. Ce processus a été confirmé par des tests de transmigration utilisant des cellules HL60 différenciées en neutrophiles-like, qui traversent plus facilement la barrière HPMEC en cas de perte de l'intégrité vasculaire.

L'ensemble de ces travaux soulignent le rôle limité des modulateurs CFTR sur l'inflammation et révèlent l'implication de PROK1 dans la perméabilité vasculaire pulmonaire. Une meilleure compréhension des mécanismes endothéliaux mis en place dans un contexte inflammatoire ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques ciblant l'inflammation dans la mucoviscidose.