

Université de Montréal

Fonction de CFTR dans les processus de réparation de l'épithélium des voies aériennes et  
développement de nouvelles stratégies thérapeutiques en fibrose kystique

Par Nguyen Thu Ngan Trinh

Département de Médecine, Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)  
en Sciences Biomédicales

Avril 2014

© Nguyen Thu Ngan Trinh, 2014

## Résumé

La pathologie de la fibrose kystique (FK) est causée par des mutations dans le gène codant pour le canal CFTR. La mutation la plus commune est la délétion du résidu Phe508 ( $\Delta F508$ ), qui entraîne un mauvais repliement et la dégradation de la protéine mutée. Ainsi, l'absence du CFTR cause un dysfonctionnement du transport ionique et liquidien qui altère le phénomène de clairance mucociliaire. Il en résulte une accumulation de mucus visqueux obstruant les voies aériennes favorisant une colonisation bactérienne, spécialement par *P. aeruginosa*, et une inflammation chronique. Ces phénomènes entraînent des lésions épithéliales et un remodelage des voies aériennes. Selon nos analyses ultrastructurales de poumons issus de patients FK au moment de la transplantation, certaines zones de l'épithélium FK montrait des signes de d'initiation des processus de réparation. Malgré cela, un dommage épithélial progressif est observé chez les patients FK et il apparaît évident que les processus de réparation sont insuffisants pour permettre le rétablissement de l'intégrité épithéliale.

Le principal objectif de mon étude était d'étudier le rôle du CFTR dans les mécanismes de réparation de l'épithélium FK et de déterminer l'impact de la correction du CFTR sur la réparation épithéliale et ce, en condition aseptique et en présence d'infection. Mes travaux montrent que l'épithélium des voies aériennes FK présente un défaut de réparation, associé, du moins en partie, à l'absence d'un CFTR fonctionnel. De plus, nous avons démontré pour la première fois que l'application du correcteur du CFTR VRT-325 permettait, non seulement, la maturation du CFTR, mais également une amélioration de la capacité des monocouches de cellules des voies aériennes FK à se réparer. D'autre part, nous avons montré que la présence du filtrat bactérien de *P. aeruginosa* (PsaDM) altérait non seulement l'expression et la fonction du CFTR, mais également les processus de réparation épithéliale. Enfin, nos résultats montrent que l'infection affecte la maturation du CFTR induite par le VRT-325 et diminue les effets bénéfiques du VRT-325 sur la réparation épithéliale.

Mes travaux permettent de mieux comprendre le rôle du CFTR dans les processus de réparation de l'épithélium FK et de proposer une nouvelle approche thérapeutique visant à promouvoir la régénération épithéliale chez les patients FK afin de tenter de stabiliser leur état, malgré l'effet délétère de la composante infectieuse.

**Mots clés** : Correcteur de CFTR, infection, lésions épithéliales, processus de réparation

## **Abstract**

The Cystic fibrosis (CF) pathology is caused by mutations of the gene coding for the CFTR channel. The most common mutation is the deletion of Phe508 ( $\Delta$ F508) causing protein misfolding and degradation. Thus, the absence of CFTR channel causes the dysfunction of ion and fluid transport that impairs mucociliary clearance resulting in mucus thickening and plugging in the airways. These conditions then favor *P. aeruginosa* bacterial colonisation and inflammation in the airways, which contribute to airway damage and remodeling. Ultrstructural analysis of bronchial sections of lungs collected from CF patients at the time of transplantation showed some area with signs of ongoing epithelial repair. However, a progressive epithelial damage is still observed in CF patients and it appears that the repair process is insufficient to restore epithelial integrity.

The main objective of my work was to study the role of CFTR in the CF repair processes and to explore the impact of CFTR correction on epithelial repair under pathogen-free condition as well as in the presence of infectious products. Our study showed that CF airway epithelium exhibits a repair defect, associated, at least in part, to the absence of a functional CFTR channel. Furthermore, we demonstrated for the first time that CFTR rescue with the CFTR corrector VRT-325 significantly improved the wound-healing capacity of CF epithelial cell monolayers. Then, we showed that the presence of bacterial filtrate, more precisely *P. aeruginosa* diffusible material (PsaDM), not only alter CFTR function and expression, but also impaired epithelial repair processes. Finally, our results suggested that infection has a deleterious impact on CFTR rescue, and affected the beneficial effect on epithelial repair processes induced by VRT-325.

My work allows to better understand the role of CFTR in the CF epithelial repair mechanisms and to propose new therapeutic strategies to promote epithelial regeneration in CF patients in attempt to stabilize their condition, despite the deleterious impact of infection.

**Keywords:** CFTR corrector, infection, epithelial injury, repair processes

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	p ii
<b>Abstract</b> .....	p iii
<b>Liste des figures</b> .....	p viii
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	p ix
<b>Remerciements</b> .....	p xiii

### **Chapitre 1 – Introduction**

1.1) Maladie de la fibrose kystique, généralités .....	p1
1.1.1) Le canal CFTR.....	p2
1.1.1.1) Localisation et fonctions du canal CFTR .....	p2
1.1.1.2) Structure du canal CFTR .....	p3
1.1.1.3) Régulation du canal CFTR .....	p5
1.1.2) Classes de mutations.....	p6
1.1.2.1) Mutations de classe I .....	p6
1.1.2.2) Mutations de classe II .....	p7
1.1.2.3) Mutations de classe III.....	p8
1.1.2.4) Mutations de classe IV .....	p8
1.1.2.5) Mutations de classe V.....	p8
1.1.2.6) Mutations de classe VI .....	p8
1.2) La relation génotype-phénotype .....	p9
1.3) La pathologie respiratoire.....	p9
1.3.1) Dysfonctionnement du transport ionique et de la clairance mucociliaire .....	p10
1.3.1.1) Débalancement du transport ionique .....	p10
1.3.1.2) Volume périciliaire et clairance mucociliaire.....	p11
1.3.2) Infection et inflammation .....	p13
1.3.2.1) Incidence des pathogènes .....	p13
1.3.2.2) Le cercle vicieux d’infection et d’inflammation .....	p15

1.3.3) Les lésions épithéliales et le remodelage tissulaire .....	p17
1.3.3.1) Atteinte lésionnelle en fibrose kystique.....	p17
1.3.3.2) Origines des lésions épithéliales.....	p18
1.3.3.3) Conséquences pathologiques des lésions épithéliales .....	p20
1.3.4) Les processus de réparation épithéliale .....	p21
1.3.4.1) Les mécanismes de réparation en condition normale .....	p21
1.3.4.2) Les facteurs impliqués dans la régulation de la réparation épithéliale .....	p23
1.3.4.2.1) Le rôle des facteurs de croissance dans la réparation épithéliale .....	p23
1.3.4.2.2) Impact de l'infection sur la réparation épithéliale .....	p24
1.3.4.2.3) Le rôle de l'inflammation dans la réparation épithéliale.....	p25
1.3.4.2.4) Le rôle des canaux ioniques dans la réparation épithéliale .....	p26
1.3.4.2.4.1) Le rôle des canaux K <sup>+</sup> dans la réparation épithéliale.....	p26
1.3.4.2.4.2) Le rôle des canaux CFTR dans la réparation épithéliale .....	p28
1.3.5) Les processus de réparation en fibrose kystique .....	p29
1.4) Thérapies et traitements en fibrose kystique .....	p30
1.4.1) La thérapie génique .....	p31
1.4.2) Les antibiothérapies.....	p32
1.4.2.1) Les macrolides.....	p32
1.4.2.2) Les antibiotiques contre <i>P. aeruginosa</i> .....	p32
1.4.2.3) Les antibiotiques ciblant les autres bactéries.....	p33
1.4.3) Les thérapies anti-inflammatoires .....	p33
1.4.4) Les thérapies anti-protéasiques.....	p34
1.4.5) Les thérapies favorisant l'hydratation de l'ASL.....	p34
1.4.5.1) Solution hypertonique et mannitol .....	p34
1.4.5.2) La modulation du transport ionique.....	p34
1.4.5.3) Les agents mucolytiques.....	p35
1.4.6) La transplantation pulmonaire .....	p35
1.4.7) Les thérapies adaptées aux classes de mutations.....	p35
1.4.7.1) Thérapies pour les mutations de classe I .....	p35
1.4.7.2) Thérapies adaptées aux mutations de classe III.....	p36
1.4.7.3) Thérapies adaptées aux mutations de classe II .....	p37

1.4.7.3.1) Les chaperonnes chimiques .....	p38
1.4.7.3.2) Les chaperonnes pharmacologiques .....	p38
1.4.8) Conclusions concernant les thérapies en fibrose kystique.....	p42
<b>Chapitre 2 – Hypothèses de travail .....</b>	<b>p43</b>
 <b>Chapitre 3 – Résultats publiés et contribution aux articles</b>	
3.1) Résultats publiés et contribution aux articles	
Article #1- Résultats publiés et contribution aux travaux.....	p47
Article #1- <i>Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue</i> .....	p50
3.2) Résultats et contribution aux articles	
Article #2 – Manuscrit soumis et contribution aux travaux.....	p48
Article #2- <i>Deleterious impact of Pseudomonas aeruginosa on CFTR expression and function in airway epithelial cells</i> .....	p61
 <b>Chapitre 4 – Discussion et perspectives</b>	
4.1) Limitations des modèles cellulaires et expérimentaux .....	p91
4.1.1) Limitations des modèles cellulaires FK et non-FK .....	p91
4.1.2) Limitations du modèle de plaie mécanique .....	p93
4.1.3) Limitations du modèle d'infection .....	p94
4.2) L'épithélium fibrose kystique.....	p96
4.2.1) Analyse ultrastructurale de l'épithélium fibrose kystique .....	p96
4.2.2) Le défaut de réparation de l'épithélium fibrose kystique .....	p97
4.2.2.1) Le défaut de base de l'épithélium fibrose kystique et le rôle du CFTR .....	p97
4.2.2.2) Impact de l'infection sur la réparation de l'épithélium fibrose kystique.....	p100
4.2.2.2.1) Impact de l'infection sur le CFTR dans le cadre de la réparation de l'épithélium fibrose kystique .....	p104
4.2.2.3) L'impact de l'inflammation sur la réparation de l'épithélium fibrose kystique .....	p106

4.2.2.3.1) Impact de l'inflammation sur le CFTR dans le cadre de la réparation de l'épithélium fibrose kystique.....	p108
4.2.3) La correction de CFTR dans l'épithélium fibrose kystique .....	p108
4.2.3.1) L'impact de l'infection sur la correction de CFTR dans l'épithélium fibrose kystique.....	p110
4.2.3.2) Les alternatives possibles pour l'épithélium fibrose kystique.....	p112
<b>Chapitre 5 – Conclusion</b> .....	p115
<b>Bibliographie</b> .....	p117
<b>Annexe</b> .....	p143

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Conséquences de la pathologie de la fibrose kystique sur les organes.....	p1
<b>Figure 2.</b> Maintien du transport ionique dans les voies aériennes .....	p3
<b>Figure 3.</b> Structure du canal CFTR .....	p4
<b>Figure 4.</b> Classes de mutations du CFTR.....	p6
<b>Figure 5.</b> Conséquences de la délétion F508.....	p7
<b>Figure 6.</b> Transport transépithélial des voies aériennes .....	p11
<b>Figure 7.</b> Clairance mucociliaire et mouvement ciliaire .....	p12
<b>Figure 8.</b> Accumulation du mucus obstruant les voies aériennes .....	p12
<b>Figure 9.</b> Modification ultrastructurale la plus observée en FK : la bronchiectasie .....	p17
<b>Figure 10.</b> Processus de réparation épithéliale.....	p22
<b>Figure 11.</b> Modèle du phénomène de migration cellulaire .....	p23
<b>Figure 12.</b> Thérapies adaptées aux classes de mutations .....	p36
<b>Figure 13.</b> Inhibition de la réparation épithéliale suite à un traitement avec le filtrat bactérien de <i>P. aeruginosa</i> dans les monocouches cellulaires non-FK et FK .....	p101
<b>Figure 14.</b> Absence d'apoptose dans les monocouches cellulaires non-FK et FK suite à un traitement avec le filtrat bactérien de <i>P.aeruginosa</i> .....	p103
<b>Figure 15.</b> Stimulation de la réparation épithéliale suite à un traitement avec le correcteur de CFTR VRT-325 et le potentiateur de CFTR VX-770 .....	p110
<b>Figure 16.</b> L'amélioration de la réparation induite par le correcteur de CFTR VRT-325 est inhibée suite à une exposition au filtrat bactérien de <i>P. aeruginosa</i> .....	p112
<b>Figure 17.</b> Amélioration de la réparation induite par l'activateur du canal $K_{ATP}$ en présence de filtrat bactérien de <i>P. aeruginosa</i> .....	p114



## Sigles et abréviations

**$\alpha$ 1-AT** : protéase  $\alpha$ 1-antitrypsine

**$\Delta$ F508** : délétion du résidu phénylalanine 508

***A. xylooxidans*** : bactérie *Achromobacter xylooxidans*

**AAV** : adénovirus (*adeno-associated virus*)

**ABC** : famille de transporteur des cassettes liant l'ATP (*ATP binding cassette*)

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADP** : adénosine diphosphate

**AMP** : adénosine monophosphate

**AMPc** : adénosine monophosphate cyclique

**AMPK** : protéine kinase activée par l'AMP (*AMP-activated protein kinase*)

**ANO1** : canal Cl<sup>-</sup> activé par le Ca<sup>2+</sup> anoctamine-1

**AP-1** : protéine activatrice 1 (*activator protein 1*)

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNm** : acide ribonucléique messenger

**ATP** : adénosine triphosphate

**ASL** : liquide de surface des voies aériennes (*airway surface liquid*)

***B. cepacia***: bactérie *Burkholderia cepacia*

**BAL** : lavage broncho-alvéolaire

**C-terminal** : carboxy-terminal

**Ca<sup>2+</sup>** : ion calcium

**CaCC** : canal Cl<sup>-</sup> dépendant du calcium (*calcium-activated chloride channel*)

**CAL** : ligand associé au CFTR (*CFTR-associated ligand*)

**Cellule NK** : cellule tueuse naturelle (*natural killer cell*)

**CFTR** : régulateur transmembranaire de la fibrose kystique (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)

**Cl<sup>-</sup>** : ion chlorure

**CLC** : canal chlore (*chloride channel*)

**Domaine R** : domaine régulateur

**EGF** : facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor*)

**EGFR**: récepteur de l'EGF (*EGF receptor*)

**ENaC** : canal sodique épithélial (*epithelial Na<sup>+</sup> channel*)

**FGF** : facteur de croissance des fibroblastes (*fibroblast growth factor*)

**FK** : fibrose kystique

**GSH** : glutathion

***H.influenzae*** : bactérie *Haemophilus influenzae*

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène

**HB-EGF** : facteur de croissance épidermique se liant à l'héparine (*heparin-binding epidermal growth factor*)

**HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** : anion bicarbonate

**HeLa** : cellules d'Henrietta Lacks

**hERG** : canal K<sup>+</sup> gène humain éther-à-go-go (*human Ether-à-go-go-Related Gene*)

**HGF** : facteur de croissance des hépatocytes (*hepatocyte growth factor*)

***I. limosus*** : bactérie *Inquilinus limosus*

**IκB** : inhibiteur κB

**ICAM-1** : molécule d'adhésion intercellulaire 1 (*intercellular adhesion molecule 1*)

**IFNγ** : interféron-γ

**IL-X** : interleukine

**IKK** : kinase de IκB

**K<sup>+</sup>** : ion potassium

**K<sub>ATP</sub>** : canal potassique sensible à l'ATP

**KGF** : facteur de croissance des kératinocytes (*keratinocyte growth factor*)

**Kv (canal)** : canal potassique dépendant du voltage

**LPS** : lipopolysaccharide

**LTB<sub>4</sub>** : leucotriène B<sub>4</sub>

**MAPK** : protéine kinase mitogène-activée (*mitogen activated protein kinase*)

**MDCK** : cellules rénales de chien de la lignée Madin-Darby (*Madin-Darby Canine Kidney*)

**MMP** : métalloprotéinase matricielle (*matrix metalloproteinase*)

**MSD** : domaines transmembranaires (*membrane-spanning domain*)

**MUC** : mucine

**mV** : millivolt

**N-terminal** : amino-terminal

**Na<sup>+</sup>** : ion sodium

**Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase** : pompe sodium/potassium

**NBD** : domaines de liaison des nucléotides (*nucleotide binding domain*)

**NFκB**: facteur nucléaire κB (*nuclear factor κB*)

**NHE1**: échangeur sodium-proton 1 (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1*)

**NHERF** : facteur régulateur de l'échangeur sodium/proton (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange regulator factor*)

**NK (cellule)**: cellule tueuse naturelle (*natural killer*)

**ORCC** : canal chlore à rectification sortante (*outwardly rectified chloride channel*)

***P. aeruginosa*** : bactérie *Pseudomonas aeruginosa*

***P. apista*** : bactérie *Pandoraea apista*

**P2Y<sub>2</sub>** : récepteur purinergique de type P2Y<sub>2</sub>

**PA01** : souche de laboratoire de *Pseudomonas aeruginosa*

**PASP** : petite protéase de *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa small protease*)

**PCL** : liquide périciliaire (*periciliary liquid*)

**PDGF** : facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Platelet-derived growth factor*)

**PKA** : protéine kinase A

**PKC** : protéine kinase C

**PP2A** : protéine phosphatase 2A

**PRR** : récepteurs de reconnaissance de motifs (*pattern recognition receptor*)

**PTC** : codons stop prématurés (*premature termination codon*)

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : superoxyde

**RNA** : ARN, acide ribonucléique

**ROS** : espèce réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*)

**RSV** : virus syncytial respiratoire (*respiratory syncytial virus*)

***S.aureus*** : bactérie *Staphylococcus aureus*

***S. maltophilia*** : bactérie *Stenotrophomonas maltophilia*

**SARM** : bactérie *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

**shRNA** : ARN interférent (*short hairpin RNA*)

**SLPI** : inhibiteur sécrétoire de la protéase leucocytaire (*secretory leukocyte protease inhibitor*)

**SYN** : syntaxine

**TGF** : facteur de croissance transformant (*transforming growth factor*)

**TIMP-1** : Inhibiteur tissulaire de metalloproteinases matricielles type-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase-1*)

**TM** : segment transmembranaire du canal CFTR

**TNF**: facteur de nécrose tumoral (*tumor necrosis factor*)

**TLR**: récepteur Toll-like (*Toll-like receptor*)

**VCAM-1** : protéine de la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*)

**ZO** : protéine de jonction zonula occludens

## Remerciements

Je voudrais remercier les membres de mon jury, le D<sup>re</sup> Lise Coderre, le D<sup>re</sup> Dao Nguyen, le D<sup>r</sup> André Cantin ainsi que le D<sup>re</sup> Geneviève Mailhot pour avoir gentiment accepté d'évaluer ma thèse.

La réussite de ce projet est d'abord attribuable à ma directrice de recherche, le D<sup>re</sup> Emmanuelle Brochiero, qui m'a donné ma chance et m'a aidé à repousser mes propres limites. Elle m'a soutenue et encouragée pendant toute la durée de mon doctorat. Vous êtes une femme d'exception et pour tout, je vous dis : MERCI!

Ces dernières années passées à manipuler derrière ma paillasse a été agrémentée par les personnalités colorées des membres du laboratoire. Anik et Claudia, merci pour votre support quotidien! Je suis contente de vous compter maintenant dans mon cercle d'amies! Je n'aurais jamais réussi sans vous et votre soutien! Merci à Alban, Émilie et Manon pour tous nos beaux fous rires!!! Pour vos mots d'encouragements, votre soutien et votre joie de vivre, je vous remercie tous du plus profond de mon cœur!

Je ne serais pas qui je suis, si ça n'était pas de ma famille. Mes belles princesses, Sydney et Eva, vous êtes pour moi une motivation d'aller plus loin tous les jours et de croire en la vie. Et toi, ma petite Abby, j'ai très hâte de te voir et de te gâter! Je remercie mes sœurs et mes parents pour leur soutien constant et leur présence inestimable. Merci Maman et merci Papa pour votre amour! J'espère vous avoir à mes côtés pour encore plusieurs années! Et merci Thu Van et Thao pour toujours avoir été là pour moi dans les bons comme les mauvais jours! Je vous aime fort vous aussi!

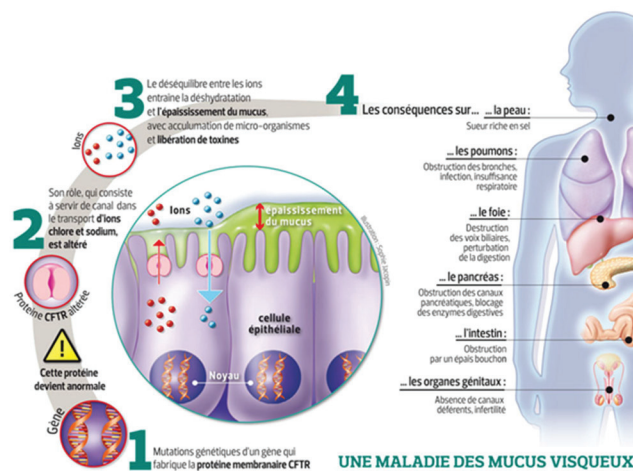
And to the love of my life and my future husband, Fred, THANK YOU! You supported me then and now (again!), thank you for that! Your patience and your presence in these hard times mean so much to me. Sorry if I ever took it out on you! Thank you for being there since the very beginning, for staying through the hard times and for looking into the best for our future! But above all, thank you for your endless love... I love you my future hubby!

## Chapitre 1 – Introduction

### 1.1) Maladie de la fibrose kystique, généralités

La fibrose kystique (FK) est une maladie autosomale récessive, causée par la mutation du gène codant pour le canal  $\text{Cl}^-$  CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)(1;2). La FK est la maladie génétique la plus répandue dans la population caucasienne. En effet, selon les données de la fondation Fibrose Kystique Canada, son incidence au pays est de 1 cas sur 3600. Toutefois, l'incidence de la maladie varie en fonction de la région géographique. Par exemple, les statistiques recueillies par l'Organisation Mondiale de la Santé indiquent que dans les pays d'Europe, l'incidence de la maladie est de 1 cas sur 2500, alors qu'en Asie, les cas reportés sont très rares.

La FK a été décrite par le pédiatre suisse D<sup>r</sup> Guido Fanconi pour la première fois en 1936 (3). En 1983, l'équipe du D<sup>r</sup> Quinton a découvert que les canaux sudoripares de patients FK montraient une perméabilité anormalement basse aux ions chlorures ( $\text{Cl}^-$ ) comparativement à ceux issus de patients sains (4). Cependant, ce n'est qu'en 1989 que le gène *cftr*, associé à la pathologie, a été cloné pour la première fois par Riordan *et al.* (5).



**Figure 1. Conséquences de la pathologie de la Fibrose kystique sur les organes.** La pathologie de la Fibrose kystique est causée par l'absence du canal CFTR, qui entraîne une dysfonction du transport ionique et liquidien au niveau de l'épithélium et des glandes exocrines. Ceci mène alors à la déshydratation de la couche de mucus, qui va s'accumuler et obstruer progressivement les voies aériennes, l'intestin grêle, les conduits du pancréas, du système reproducteur et des glandes sudoripares. (schéma tiré du site <http://www.lefigaro.fr/assets/infographie/SANTE-201116-Mucoviscidose-KARIM-grande.jpg>)

La pathologie de la FK peut affecter plusieurs organes. En effet, les manifestations cliniques les plus fréquentes sont : l'atteinte pulmonaire, la déficience pancréatique, l'obstruction intestinale distale, l'infertilité masculine et une augmentation de la teneur en sel

de la sueur. Cependant, la défaillance respiratoire demeure la majeure cause de morbidité et de mortalité chez les patients FK (voir revues (6-8))

La FK est causée par une dysfonction du transport ionique et liquidien au niveau des épithélia et des glandes exocrines. Ce phénomène mène alors à la déshydratation de la couche de mucus, la rendant plus épaisse et visqueuse. Son accumulation au niveau de l'épithélium va progressivement causer des obstructions dans les voies aériennes, l'intestin grêle, les conduits du pancréas, du système reproducteur et des glandes sudoripares (voir **Figure 1**) (9;10).

### **1.1.1) Le canal CFTR**

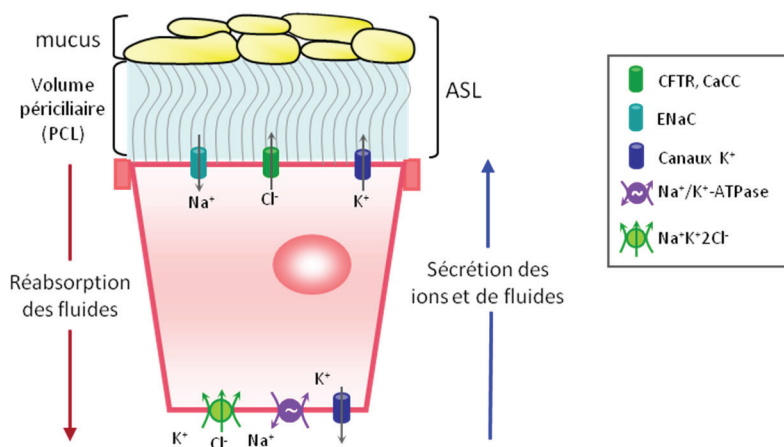
#### **1.1.1.1) Localisation et fonctions du canal CFTR**

Le canal CFTR se retrouve au pôle apical des cellules épithéliales au niveau des voies aériennes, dans les alvéoles, mais aussi dans les cellules séreuses des glandes sous-muqueuses (11-13). Le canal CFTR joue un rôle crucial pour le développement des tissus pulmonaires durant la gestation (12) et tout au long de la vie adulte en contrôlant le volume de liquide de surface (ASL) au niveau des voies aériennes, qui est constitué du liquide périliciliaire (PCL) et d'une couche de mucus (14-18) (voir **section 1.3.1.1**). Il participe également à la régulation de la clairance alvéolaire (19;20). Dans les glandes sous-muqueuses des voies aériennes, il a été suggéré que le canal CFTR était capable de transporter du  $\text{HCO}_3^-$  en plus du  $\text{Cl}^-$  et de jouer un rôle important pour la sécrétion de liquide afin d'humidifier le mucus sécrété par ces cellules (21;22). Le CFTR, également exprimé à la membrane d'organelles, telles que les lysosomes et l'appareil de Golgi, est aussi capable de réguler le pH en rétablissant la neutralité électrique durant le processus d'acidification de celles-ci, phénomène important pour plusieurs réactions biochimiques (23). Un rôle dans la modulation de certains processus d'endocytose et d'exocytose, ainsi que de régulateur de l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires lui a également été attribué (24).

Il a été suggéré que le CFTR joue aussi un rôle de régulateur de plusieurs mécanismes de transport, tels que le canal  $\text{Cl}^-$  à rectification sortante ORCC (23;25), les aquaporines (26), les canaux  $\text{K}^+$  (27;28), l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (26;29) ainsi que le canal  $\text{Na}^+$  ENaC (26;30). La relation la plus étudiée est celle entre ENaC et CFTR, mais leur mécanisme d'interaction fonctionnelle demeure, à ce jour, toujours controversée. En effet, certaines études indiquent que l'absence de CFTR causerait une hyperabsorption de  $\text{Na}^+$  (17;23;30), alors que dans

d'autres modèles, aucune régulation négative d'ENaC par CFTR ne semble exister (1). Il est probable que les mécanismes de régulation des transports ioniques puissent se faire via des variations du gradient électrochimique suite aux changements de fonction du canal CFTR.

Ainsi, le canal CFTR assure un rôle indispensable dans le maintien du transport ionique et de l'hydratation de l'ASL au niveau de l'épithélium des voies aériennes (voir **Figure 2**). La pathologie de la FK, dans laquelle le CFTR est absent ou dysfonctionnel dans plusieurs tissus et organes, ne fait que confirmer l'importance du transport ionique médié par celui-ci (voir **section 1.3.1.1**).

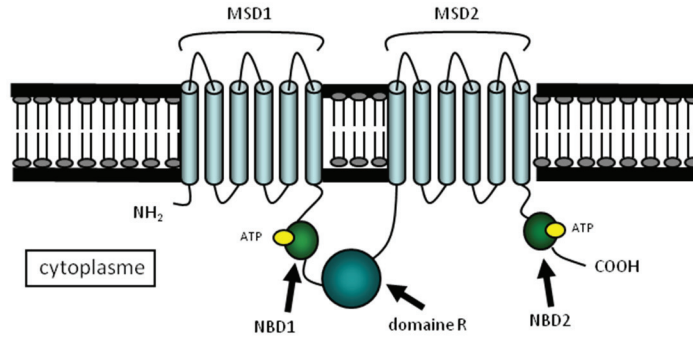


**Figure 2. Schéma du transport dans les voies aériennes saines.** Représentation schématique du transport ionique et liquidien dans une cellule des voies aériennes saines. Le canal CFTR ainsi que différents mécanismes de transport sont impliqués dans la régulation du volume du liquide de surface des voies aériennes (ASL).

### 1.1.1.2) Structure du canal CFTR

Le CFTR a été identifié à l'aide d'un clonage positionnel en 1989 (5). Le gène du canal Cl<sup>-</sup> CFTR, situé sur le chromosome 7q31.2, est constitué de 27 exons et code pour une protéine de 1 480 acides aminés. Le canal CFTR fait partie de la famille des transporteurs ABC (*ATP binding cassette*), connus pour permettre le transport d'un large éventail de molécules à travers la membrane cellulaire grâce à l'hydrolyse de l'ATP (31;32). De par son homologie avec les protéines de la famille ABC, il a d'abord été proposé que le CFTR soit une protéine régulatrice qui, via des interactions protéiques, modulait le courant Cl<sup>-</sup> activé par l'AMPC dans les cellules épithéliales (33). Par de nombreuses expériences d'expression dans des systèmes hétérologues et de mutagenèse dirigée, il a été démontré, quelques années plus tard, que le CFTR était le canal responsable du courant Cl<sup>-</sup> dépendant de l'AMPC et qu'il était dysfonctionnel dans la pathologie de la FK (33-36).





**Figure 3. Structure du canal CFTR.** Représentation du canal CFTR composé de deux domaines transmembranaires (*MSD*, *membrane-spanning domain*), de deux domaines de liaison aux nucléotides (*NBD*, *nucleotide binding domain*) et d'un domaine régulateur (domaine R).

La protéine CFTR se compose de 2 domaines transmembranaires (*MSD*, *membrane-spanning domain*), de 2 domaines de liaison des nucléotides (*NBD*, *nucleotide binding domain*) et d'un domaine régulateur (domaine R). L'arrangement séquentiel des domaines transmembranaires est MSD1 - NBD1 - domaine R - NBD2 - MSD2 et tous les domaines transmembranaires sont reliés par des boucles extra- et intracellulaires. Les extrémités N-terminale et C-terminale du canal sont intracytoplasmiques (voir **Figure 3**) (9;37). Chacun des MSD est composé de six hélices amphipathiques transmembranaires (TM) (32;38;39) et il semblerait que les TM1, TM5, TM6, TM11 et TM12 entrent dans la formation du pore (31;33). Les NBD sont des domaines hydrophiles et leur dimérisation en un complexe de tête-à-queue est stabilisée par des ponts hydrogènes entre le motif Walker du NBD1 et la séquence LSHGH du NBD2, et entre la séquence LSGGQ du NBD1 et le motif Walker du NBD2. Ces interactions forment deux sites de liaisons à l'ATP, l'un d'eux étant dit stable (site I : liaison d'ATP, sans hydrolyse), alors que l'autre est dit instable (site II : liaison d'ATP, avec hydrolyse) (32;40;41). Le domaine R, composé d'une grande proportion de résidus polaires, possède plusieurs sites consensus de phosphorylation par les kinases PKA et PKC (30;31;33;42).

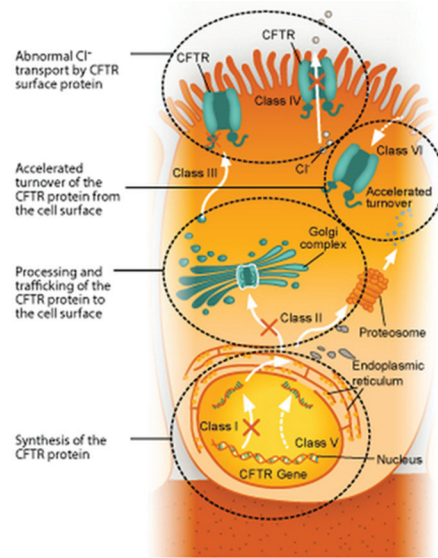
Les mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal ne sont pas encore tout à fait élucidés. Il semble toutefois de plus en plus évident que les mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal dépendent de la liaison d'ATP (aux sites I et II) et de son hydrolyse au site II, ce qui en fait un canal ligand-dépendant (*ligand gated channel*) (43). À l'état inactif du canal, le domaine R interagirait avec les NBD empêchant ainsi leur interaction. Suite à la phosphorylation du domaine R, ces interactions s'affaibliraient pour permettre la dimérisation

des NBD en complexe de tête-à-queue et la liaison de l'ATP. Toutefois, il n'est pas encore clair si l'hydrolyse de l'ATP favorise l'ouverture et/ou la fermeture du canal. Il a été suggéré que l'extrémité N-terminale du CFTR interagirait avec le domaine R phosphorylé et stabiliserait l'interaction entre les NBD ainsi que l'état ouvert du canal (44). En interagissant avec des protéines, comme la PP2A, l'AMPK et/ou des protéines à domaine PDZ (ex. : NHERF et CAL), l'extrémité C-terminale serait également capable de moduler le mécanisme d'ouverture et de fermeture du canal (45).

Le CFTR se distingue des autres membres de la famille des transporteurs ABC, puisqu'il est bien un canal et non pas un transporteur, qu'il possède un domaine régulateur et ne dépend pas seulement de l'énergie de l'hydrolyse d'ATP pour fonctionner. En fait, le domaine NBD2 du CFTR posséderait une fonction ATPase, mais également une fonction d'adénylate kinase, qui limiterait ainsi la consommation d'ATP du CFTR. En effet, cette fonction enzymatique favorise la production rapide d'ATP en cas d'excès d'AMP et d'ADP ou en cas de besoin d'énergie intense (46).

### **1.1.1.3) Régulation du canal CFTR**

De nombreux mécanismes sont impliqués dans la régulation de l'expression et de l'activité du canal CFTR. D'une part, la régulation de l'expression de CFTR peut se faire au niveau de l'adressage de la protéine à la membrane. En effet, l'extrémité N-terminale du canal serait capable d'interagir avec la protéine SYN8, qui est impliquée dans l'inhibition du processus d'exocytose, et avec la protéine CAL dans le recyclage du canal au complexe de dégradation lysosomale (45). D'autre part, il a été montré que l'interaction entre l'extrémité C-terminale et des protéines à domaines PDZ, telles que le complexe ezrin-NHERF1-actine, faciliterait l'exocytose de CFTR. Enfin, il semblerait que la dimérisation du CFTR induite par la PKA pourrait réduire son recyclage à la membrane (45). Pour ce qui est de la régulation de l'activité du canal CFTR, elle peut avoir lieu par l'intermédiaire des nucléotides triphosphates extracellulaires nécessaires aux mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal. Elle peut se faire aussi via son interaction avec d'autres protéines pour favoriser la stabilisation de son état ouvert /fermé, via l'activité de la PKA stimulant sa conductance, ou alors via une augmentation de la concentration d'AMPc induite par les agonistes  $\beta$ -adrénergiques (26;45;47).



**Figure 4. Classes de mutations du CFTR.** Schématisation des six classes de mutations du gène du CFTR. (Schéma tirée du site <http://www.cftr.info/about-cf/role-of-ctfr-in-cf/cftr-mutations/the-six-classes-of-cftr-defects/>)

### 1.1.2) Classes de mutations

Dans la pathologie de la FK, l'atteinte de la protéine varie selon le type de mutation. Des mutations sur toute la longueur du gène *cftr* ont été recensées et, à ce jour, près de 2000 différentes mutations ont été répertoriées. Celles-ci ont été regroupées en différentes classes de mutations selon leur impact sur la structure de la protéine ou sur l'activité du canal (voir **Figure 4**) (24;37). La mutation la plus fréquente chez les patients FK, qui constitue environ 75 % des cas, est la délétion du résidu Phe508 ( $\Delta F508$ ). Les mutations les plus communes après  $\Delta F508$  sont G542X, G551D, N1303K et W1282X avec des fréquences à peine plus élevées que 1% (9;37).

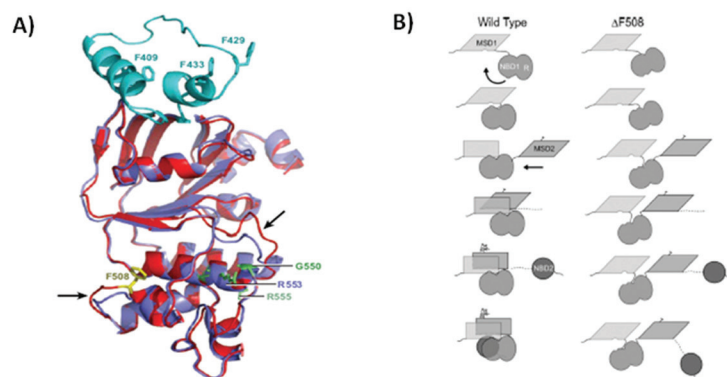
#### 1.1.2.1) Mutations de classe I

La première classe regroupe les mutations entraînant des problèmes de biosynthèse du CFTR. Les différents types de mutations sont : 1) les mutations qui causent un décalage du cadre de lecture menant à la synthèse d'un autre peptide, 2) les mutations au niveau du promoteur du gène qui réduisent l'efficacité de la transcription, 3) les mutations faux-sens qui causent le remplacement d'un nucléotide par un autre, ainsi que 4) les mutations non-sens qui changent un nucléotide d'un codon en le transformant en codon stop, ce qui engendre l'arrêt prématuré de la transcription. En effet, la majeure partie de ces mutations va affecter l'étape

de transcription, donnant lieu à des protéines tronquées ou une absence totale de la protéine (9;28;48-50).

### 1.1.2.2) Mutations de classe II

Les mutations affectant la maturation des protéines se retrouvent dans cette classe. La mutation  $\Delta F508$  est plus étudiée, parce que c'est la mutation la plus fréquente chez les patients FK. De nombreuses études ont démontré que la protéine CFTR- $\Delta F508$  serait retenue dans le réticulum endoplasmique puis dégradée, au lieu de se rendre à l'appareil de Golgi pour être glycosylée; elle n'atteindrait ainsi jamais la membrane cellulaire (32;39). La localisation de cette mutation sur le NBD1 entraînerait le mauvais repliement du canal et donc, une déstabilisation globale de la structure quaternaire de la protéine (32;39) (voir **Figure 5**).



**Figure 5. Conséquences de la délétion  $\Delta F508$ .** A) La superposition de la modélisation moléculaire 3D du NBD1 du CFTR-wt et du CFTR- $\Delta F508$  permet de discerner les différences majeures au niveau de deux boucles (indiquées par les flèches) dans la structure NBD1- $\Delta F508$ . (Image tirée de Riordan JR *Annu Rev Biochem.* 2008) B) Schématisation du processus de repliement de la protéine CFTR-wt et CFTR- $\Delta F508$ . (Schéma tiré de Cui et al. *J. Mol Biol* 2007)

Durant le processus de repliement, cette mutation altérerait les interactions entre le NBD1 et les autres domaines. Plus précisément, l'interaction entre le NBD1 et le MSD1, essentielle à la stabilité de la protéine, serait d'abord altérée, ce qui affecterait l'assemblage entre le MSD1 et MSD2, causant ainsi l'interruption de la traduction des autres domaines du canal (32;39;51;52). La protéine mutée, incomplète et mal repliée serait reconnue par les chaperonnes impliquées dans le contrôle de qualité. La protéine CFTR serait ainsi redirigée vers le complexe lysosomal, où elle serait dégradée (53;54). Durant le processus de contrôle de qualité, le CFTR muté serait visé par différentes ubiquitines ligases qui le marqueraient pour le diriger vers une dégradation co- ou post-traductionnelle (55). Tous ces phénomènes

entraîneraient donc une absence de canal CFTR à la membrane cellulaire, ce qui cause un phénotype sévère de la maladie.

### **1.1.2.3) Mutations de classe III**

Les mutations de la troisième classe se retrouvent au niveau des NBD et affectent les mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal ainsi que sa régulation. La mutation la plus connue de cette classe est la mutation G551D (7). Avec ce type de mutation, la liaison de l'ATP et son hydrolyse seraient toutes les deux réduites. Ainsi, il semblerait que le canal soit capable de se rendre à la membrane apicale, mais il serait non-fonctionnel et ne répondrait plus à la stimulation à l'AMPc (9;28;48-50).

### **1.1.2.4) Mutations de classe IV**

La classe IV regroupe les mutations affectant les segments impliqués dans la formation du pore du canal. Les mutations R117H, R334W et R347P entraînent ainsi une diminution de la conductance unitaire. Dans cette classe, sont également incluses certaines mutations au niveau du domaine R qui peuvent aussi affecter la conductance du canal. Ce type de mutations entraînerait un phénotype moins sévère puisqu'un faible courant Cl<sup>-</sup> résiduel pourrait être suffisant pour rétablir partiellement l'homéostasie de l'épithélium des voies aériennes (9;28;48-50).

### **1.1.2.5) Mutations de classe V**

Les mutations entraînant un processus d'épissage aberrant ou alternatif de l'ARNm se retrouvent dans cette classe. Comme dans le cas de l'épissage de l'exon 9, les protéines résultantes sont instables et le nombre de protéines complètes à la membrane est grandement réduit (9;37). Dans ce cas-ci, grâce à la présence partielle de CFTR à la membrane, le phénotype s'avère moins sévère.

### **1.1.2.6) Mutations de classe VI**

La sixième classe implique un type de mutation qui se retrouverait à l'extrémité C-terminale de la protéine et causerait sa troncation, affectant ainsi la stabilité du canal CFTR. En fait, il semblerait que l'absence de la queue C-terminale n'affecterait ni la structure, ni le

repliement, ni même la maturation du peptide puisqu'une activité du canal peut être mesurée. Toutefois, l'extrémité C-terminale se montre importante pour la stabilité de la protéine, puisque des mutations dans cette partie entraînent une baisse dramatique du nombre de canaux à la membrane. Ainsi, la demi-vie du CFTR tronqué serait raccourcie de 5 à 6 fois par rapport à un canal normal (9;37).

## **1.2) La relation génotype-phénotype**

L'absence ou la dysfonction du canal peut entraîner des atteintes sur différents organes dont le pancréas, le système reproducteur, les glandes sudoripares, l'intestin grêle et les poumons. La prédiction des phénotypes en accord avec la classe de mutation n'est que théorique. Par exemple, il a déjà été rapporté que des membres d'une même famille portant les mêmes mutations pouvaient développer des phénotypes plus ou moins sévères. De plus, d'autres facteurs génétiques et/ou environnementaux pourraient également affecter le phénotype du patient (9;26;50).

De façon générale, les patients homozygotes pour les classes I à III sont plus sujets à souffrir de l'iléus méconial à la naissance, alors que près de 85% des patients FK avec ces classes de mutations vont développer au cours de leur vie une insuffisance pancréatique et hépatique, et ils vont souffrir de malnutrition causée par un problème de digestion et de malabsorption des nutriments. De plus, ces patients sont plus susceptibles de subir des exacerbations et voient alors leur fonction respiratoire se détériorer très rapidement. Dans le cas des patients touchés par les classes de mutations IV et V, ils souffrent souvent d'une atteinte respiratoire moins sévère et ne développent pas d'insuffisance pancréatique (50). De plus, près de 98% des patients masculins, quelque soit la classe de mutation, sont touchés par l'infertilité, causée par l'atrophie ou l'absence des canaux déférents. Enfin, pour ce qui est de l'atteinte des glandes sudoripares, qui entraîne une élévation de la concentration de sel dans la sueur, elle touche tous les patients FK peu importe le type de mutation (24;28;48).

## **1.3) La pathologie respiratoire**

La manifestation clinique la plus grave pour les patients FK est l'atteinte de la fonction respiratoire. Cependant, il ne semble pas exister de corrélation directe entre la classe de

mutation et la sévérité des symptômes de la maladie pulmonaire, qui peut être très variable même chez les patients FK portant les mêmes mutations (9).

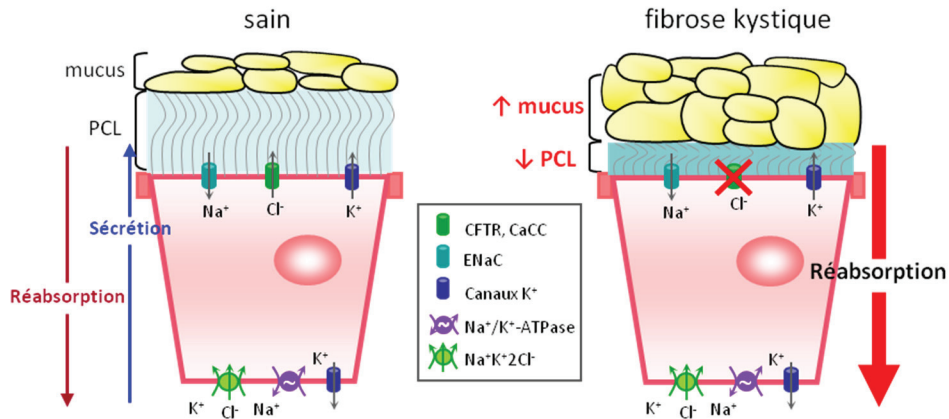
### **1.3.1) Dysfonctionnement du transport ionique et de la clairance mucociliaire**

#### **1.3.1.1) Débalancement du transport ionique**

Un des rôles de l'épithélium des voies aériennes est le maintien de l'homéostasie des fluides recouvrant cet épithélium. En effet, une bonne régulation du transport ionique et liquidien au niveau des voies aériennes est cruciale à la physiologie du poumon (15). Ce phénomène implique une variété de canaux ioniques et de transporteurs, comme les canaux  $\text{Cl}^-$  (dont le CFTR), le canal ENaC, la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, le co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  ainsi que les canaux  $\text{K}^+$ . En effet, il a été démontré que les canaux  $\text{K}^+$ , tels que le  $\text{KvLQT1}$ , le  $\text{K}_{\text{ATP}}$  et le  $\text{KCa3.1}$ , jouent des rôles importants dans le contrôle du transport transépithélial de  $\text{Cl}^-$  (56-60).

Au niveau des voies aériennes (voir **Figure 2**), les canaux  $\text{Cl}^-$  activés par le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ainsi que le canal CFTR sécrètent du  $\text{Cl}^-$ , entraînant une sécrétion liquidienne en parallèle, qui permet l'hydratation de l'ASL. Une absorption de  $\text{Na}^+$  et de liquide se produit également grâce au canal ENaC à la membrane apicale et à la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase du côté basolatéral. Les canaux  $\text{K}^+$  ainsi que le co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  permettent le recyclage des ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$  à la membrane basolatérale. L'action collective de tous ces mécanismes de transport permet une fine régulation du volume du PCL et l'hydratation de la couche de mucus, assurant ainsi les conditions optimales à une bonne clairance mucociliaire (voir **section 1.3.1.2**) (17-19;26).

Dans la pathologie de la FK, les mutations du gène *cftr* entraînent l'absence ou la dysfonction du canal  $\text{Cl}^-$  CFTR. Ce phénomène cause alors un déséquilibre entre le transport de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Cl}^-$  ainsi qu'une diminution de la sécrétion de liquide (voir **Figure 6**). Par conséquent, le PCL est grandement diminué et le dysfonctionnement de la clairance mucociliaire rend inefficace l'élimination du mucus épaissi et visqueux (17;61). De plus, il semblerait que l'absence ou la dysfonction du CFTR occasionnerait une dérégulation des différents mécanismes de transport au niveau de l'épithélium des voies aériennes. La sécrétion de fluide par les glandes sous-muqueuses dans les tissus bronchiques FK serait également diminuée (10;62-64). Il a aussi été proposé qu'une absorption accrue de  $\text{Na}^+$ , concomitante à



**Figure 6. Schéma du transport des voies aériennes saines et fibrose kystique.** L'absence ou la dysfonction du canal Cl<sup>-</sup> CFTR entraîne un déséquilibre entre le transport des fluides et des ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>, ce qui cause une diminution du volume péréciliaire (PCL) et la déshydratation de la couche de mucus.

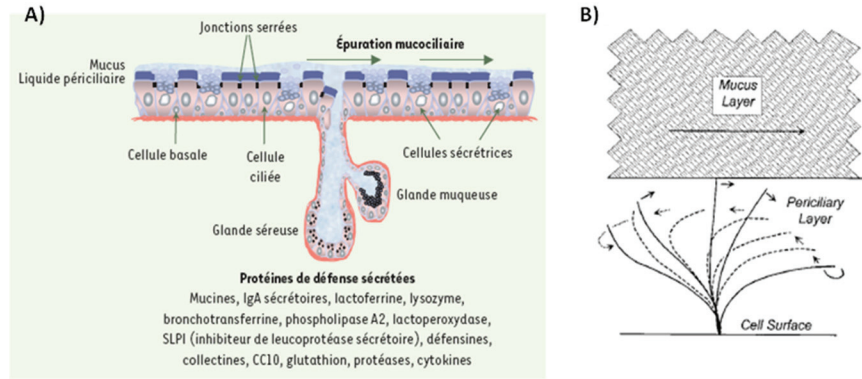
la dysfonction de sécrétion de Cl<sup>-</sup> dans les cellules FK, contribuerait à la physiopathologie de la FK (1). Un modèle de souris surexprimant ENaC sembleraient développer des symptômes semblables à ceux observés en FK (64). Ainsi, l'altération des transports de Cl<sup>-</sup>, de Na<sup>+</sup> et des fluides contribue à la déshydratation de l'ASL au niveau des voies aériennes (17-19;65).

### 1.3.1.2) Volume péréciliaire et clairance mucociliaire

La clairance mucociliaire est un mécanisme de défense mécanique visant à éliminer les agents pathogènes et les poussières inhalés auxquels les voies respiratoires sont continuellement exposées. En effet, l'air respiré est filtré tout le long du système respiratoire et les polluants aériens sont emprisonnés dans la couche de mucus recouvrant les parois des voies aériennes. Grâce au battement ciliaire, le mucus contaminé est dirigé progressivement vers le pharynx où il sera avalé et ainsi éliminé (voir **Figure 7**) (16).

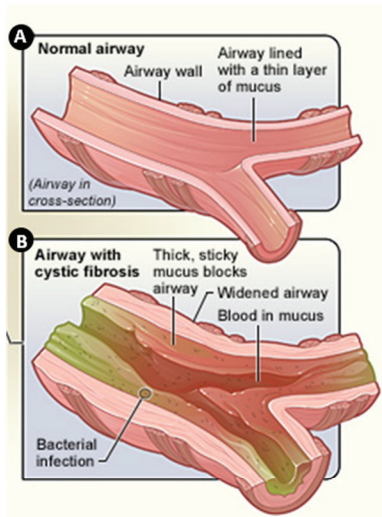
L'efficacité de ce mécanisme de défense résulte d'une régulation fine du niveau de l'ASL au niveau des voies aériennes (14-16). La couche de mucus est composée, entre autres, des mucines MUC1, MUC4, MUC5A et MUC5B et contient différentes protéines, telles que les défensines, l'inhibiteur sécrétoire de la protéase leucocytaire, la lactoferrine, la lactoperoxydase ainsi que le lysozyme. Celles-ci lui confèrent ses propriétés antimicrobiennes, antiprotéasiques et antioxydantes (14). C'est ainsi que les agents infectieux sont non seulement emprisonnés, mais sont également neutralisés avant d'être éliminés.





**Figure 7. Clairance mucociliaire et mouvement ciliaire.** **A)** L'élimination des pathogènes au niveau des voies aériennes se fait grâce à la clairance mucociliaire combinée à l'activité des protéines de défense (Schéma tiré de Coraux et al. *Med Sci (Paris)* 2005) **B)** Schématisation du mouvement du mucus par le battement ciliaire important dans le processus de clairance mucociliaire. (Schéma tiré de Matsui H et al. *J Clin Invest.* 1998)

Comme expliqué à la section précédente (**section 1.3.1.1**), chez les patients FK, la dysfonction du transport ionique, causée par les mutations du canal CFTR, entraîne une diminution du volume du PCL et la déshydratation de la couche de mucus. De plus, l'hyperplasie des cellules caliciformes cause une surproduction de mucines, ce qui amène une accumulation du mucus obstruant progressivement les voies aériennes (voir **Figure 8**) (65). De plus, chez certains patients FK, des anomalies au niveau de leurs cellules ciliées, probablement liées aux cycles d'infection, ont été rapportées et entraîneraient ainsi une



**Figure 8. Accumulation des mucus obstruant les voies aériennes.** En fibrose kystique, la diminution du volume du PCL et la déshydratation de la couche de mucus, combinées à une surproduction de mucines entraîne une accumulation du mucus obstruant progressivement les voies aériennes. Ce phénomène favorise la colonisation bactérienne et l'inflammation. (schéma adapté de l'image tirée du site <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/cf/printall-index.html>)

diminution de la fonction ciliaire (10). C'est ainsi que, d'abord, l'immobilité de mucus contaminé, puis son accumulation dans les voies aériennes et, enfin la création de zones hypoxiques sous ces plaques de mucus amèneraient l'établissement d'une infection chronique et d'une réponse inflammatoire exagérée qui cause graduellement la détérioration de l'intégrité épithéliale (65;66).

### **1.3.2) Infection et Inflammation**

#### **1.3.2.1) Incidence des pathogènes**

Un des paramètres contribuant majoritairement à la pathogenèse pulmonaire de la FK est l'infection bactérienne chronique. Selon différentes études, il semblerait que les voies aériennes soient infectées de façon séquentielle par différents pathogènes au cours de la vie des patients FK (67). En effet, il a été montré qu'en bas âge, les patients étaient surtout infectés par *S. aureus* et *H. influenzae*. Par la suite, les patients se retrouvent souvent infectés par *P. aeruginosa*. Elle infecte 10 à 30% des enfants de 0 à 5 ans et 80% des patients FK adultes. Cependant, d'autres souches ont aussi été détectées chez les patients adultes, telles que *B. cepacia*, *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans* et même des mycobactéries. Il a été démontré que les patients infectés de façon chronique avec *P. aeruginosa* étaient plus susceptibles aux infections par d'autres types de bactéries, incluant des bactéries moins communes, telles que *P. apista*, *I. limosus*, etc. (67-69). Enfin, au cours des dernières années, de plus en plus de cas de patients FK infectés par la souche de bactérie *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) ont été rapportés. En effet, il a été montré qu'une infection chronique à SARM était associée à un déclin plus rapide de la fonction respiratoire et à un taux de mortalité plus élevé (7).

L'impact combiné de ces pathogènes demeure cependant encore mal compris. En effet, il a été suggéré que les infections précoces au *S. aureus* ou au *H. influenzae* pouvait affecter l'intégrité épithéliale et ainsi favoriser la colonisation par *P. aeruginosa*. Toutefois, certaines études ont montré qu'un traitement antibiotique continu pour contrer *S. aureus* pouvait augmenter la probabilité de contracter la bactérie *P. aeruginosa* (67). De plus, il semblerait que les infections à *H. influenzae* aggravent l'état des patients non-FK souffrant de bronchiectasie, mais ce virus ne semble pas participer à la détérioration de la condition clinique des patients FK (67). Les infections à *P. aeruginosa* demeureraient les plus critiques chez les patients FK. En effet, les infections chroniques à *P. aeruginosa* sont associées à un

profil inflammatoire plus important et à une augmentation d'environ 2.6 fois du taux de mortalité. Ainsi, plus l'infection survient tôt dans la vie du patient, plus l'état du patient se détériore rapidement (67;68). Ces études démontrent que la co-infection par différents pathogènes peut avoir des effets très complexes et pourrait affecter de façon différente la progression de la pathologie de la FK d'un patient à l'autre.

Le développement des infections chroniques est causé principalement par la persistance des pathogènes dans les voies aériennes. En effet, 25% des patients, qui ont été traités pour une infection avec une antibiothérapie agressive, se retrouvent éventuellement ré-infectés par la même bactérie (68). D'une part, il se peut que les traitements n'aient pas totalement éradiqué la bactérie ciblée, ce qui peut engendrer un réservoir bactérien indétectable chez le patient. Ces bactéries peuvent ensuite infecter et coloniser à nouveau les voies aériennes, donnant ainsi lieu au développement d'une infection chronique. En effet, il a été suggéré que les sinus puissent constituer un réservoir à bactéries. D'autre part, la persistance de ces bactéries pourrait être aussi causée par une source environnementale récurrente (68).

L'environnement difficile du système respiratoire FK impose un stress sur les microorganismes qui y vivent. En effet, la combinaison des attaques du système immunitaire, le stress oxydatif causé par la réponse inflammatoire de l'hôte ainsi que la présence continue de différents antibiotiques obligent les pathogènes à s'adapter au cours de l'évolution de la pathologie. En effet, l'exposition constante au stress oxydatif et aux antibiotiques induit une augmentation importante du taux de mutations, phénomène appelé hypermutabilité. Ainsi, il semblerait que la mutation du gène *mucA* soit responsable de la conversion vers un phénotype mucoïde (68). Ce changement est associé à une diminution de la croissance bactérienne et de la motilité, un changement de l'enveloppe cellulaire, le développement d'une résistance aux antibiotiques et une augmentation de la production d'alginate. En fait, l'alginate protège les bactéries de la phagocytose par les neutrophiles et les macrophages. Leur transformation graduelle en biofilm assure leur persistance au sein des voies aériennes FK, contribuant ainsi à la progression de la maladie (68).

### 1.3.2.2) Le cercle vicieux d'infection et d'inflammation

En condition normale, l'intrusion d'un agent pathogène ou d'une particule étrangère, qui est reconnu par les récepteurs membranaires PRR (*pattern recognition receptor*), induit un processus de phagocytose par les macrophages, les monocytes ainsi que les neutrophiles polynucléaires. Ce phénomène va alors activer différentes voies de signalisation, impliquées dans la survie cellulaire, la réparation épithéliale et bien sûr le déclenchement de la réponse inflammatoire (70-75).

L'inflammation implique une cascade d'évènements qui commence d'abord par la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Ce phénomène est induit par la libération d'histamines par les mastocytes, les basophiles et les plaquettes ainsi que par l'augmentation des molécules d'adhésion (VCAM-1, E-sélectines et ICAM-1). Les phagocytes sont recrutés au site d'infection et les facteurs humoraux (protéines du complément, eicosanoïdes, kinines etc.) ainsi que les cytokines sont relarguées afin d'éliminer les pathogènes et de limiter leurs dégâts (76;77). En effet, les cytokines et/ou chémokines, produites par les cellules immunes (neutrophiles polynucléaires, lymphocytes, monocytes, macrophages et cellules NK) ainsi que par les cellules dendritiques, épithéliales, endothéliales et les fibroblastes, jouent un rôle dans la résorption de la réaction inflammatoire ainsi que dans le déclenchement de la réponse immune acquise (78;79). Ainsi, la coopération entre la réponse immune et inflammatoire permet l'élimination des pathogènes inhalés de l'épithélium respiratoire et permet la préservation de son intégrité.

Certaines études suggèrent que l'épithélium FK est plus sensible et susceptible à l'infection et l'inflammation. En effet, comme expliqué à la **section 1.3.1.2**, la dysfonction du transport ionique suivie de l'altération de la clairance mucociliaire combinée à la surproduction de mucus rendrait l'épithélium des voies aériennes FK plus susceptible à l'établissement d'infections chroniques et à la formation de biofilms bactériens (17). Il a aussi été suggéré que le canal CFTR était impliqué dans l'acidification des phagosomes et dans la régulation de la présentation d'antigène (6;80;81). Son absence pourrait alors promouvoir la persistance des bactéries dans les voies aériennes FK. Il a aussi été rapporté que la bactérie *P.aeruginosa* montrait une plus grande affinité pour l'épithélium FK (63;65;82). En effet, suite à une réponse inflammatoire excessive, la dénudation partielle ou totale de l'épithélium des voies aériennes favoriserait l'adhésion de *P.aeruginosa* (83-87). Il semblerait également

que, chez les patients FK, les neutrophiles exhibent des fonctions anormales et que certaines cellules immunes soient déficientes, ce qui favoriserait encore une fois l'infection et l'inflammation (28;88).

Dans la pathologie de la FK, le déséquilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires pourrait venir amplifier la phase inflammatoire. En effet, la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF $\alpha$ , l'interleukine-1 $\beta$ , -6 et -8, serait grandement augmentée, tandis que celle de l'interleukine-10 (IL-10), une cytokine anti-inflammatoire, serait réduite (78;82).

La voie de signalisation de NF $\kappa$ B, importante dans la transcription d'un large éventail de médiateurs inflammatoires, serait fortement activée par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (89;90). Dans les cellules FK, l'augmentation de la sécrétion de TNF et d'IL-1 $\beta$  activerait la voie de NF $\kappa$ B (91). D'ailleurs, il a été rapporté que la kinase IKK, modulant l'activité de NF $\kappa$ B, serait plus active, alors que l'expression d'I $\kappa$ B, inhibiteur de NF $\kappa$ B modulée par l'IL-10, serait diminuée (61). De plus, l'IL-10 posséderait un rôle crucial dans la résorption de la réponse inflammatoire et sa diminution donnerait lieu à une activation prolongée de la voie NF $\kappa$ B et, donc, de la phase inflammatoire (28;63;82;89;92).

Il a été rapporté que des cellules FK exposées à la bactérie *P. aeruginosa* sécrèteraient plus de TNF, d'IL-6 et d'IL-8 (28). L'IL-8, un chemoattractant important pour les neutrophiles, serait sécrétée par les cellules épithéliales ainsi que les neutrophiles. Ces derniers seraient également capables d'induire la sécrétion des leucotriènes B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), qui sont d'autres chemoattractants des neutrophiles. Par ailleurs, il semblerait que les neutrophiles FK montrent un délai dans leur apoptose, favorisant ainsi leur accumulation dans les voies aériennes FK (78;82;89;93). Suite à l'infiltration neutrophilique, de hautes concentrations de marqueurs d'inflammation, de neutrophiles ainsi que de leur produits auraient été, par conséquent, détectées dans les lavages broncho-alvéolaires (BAL) des patients FK (61). La présence des protéases et des oxydants, qui joueraient un rôle majeur dans la pathogenèse de la FK, a également été rapportée. En effet, il a été démontré que l'élastase, une des protéases neutrophiliques, était capable de stimuler la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales (61). Ensuite, le processus de phagocytose pourrait être affecté à des hautes concentrations d'élastase neutrophilique. En effet, cette protéase serait capable de cliver des opsonines et des récepteurs essentiels au mécanisme opsonophagocytaire. Enfin, les oxydants relargués par les

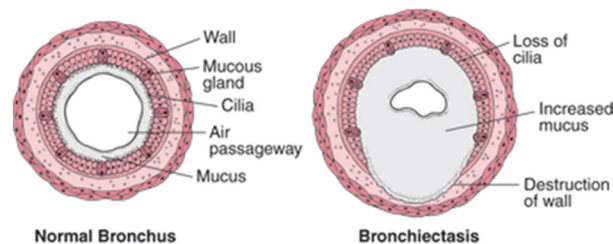
neutrophiles, soit le  $H_2O_2$  et le  $O_2^-$ , activeraient la voie NF $\kappa$ B, accentuant la phase inflammatoire (61;89;92).

Ainsi, la réponse inflammatoire excessive, incluant les protéases neutrophiliques et les radicaux libres, entraînerait la destruction des protéines structurales des voies aériennes FK (78;82;83;86;89;94;95). De plus, les bactéries et leurs exoproduits, protéases et facteurs de virulence (96-100) contribueraient aux dommages épithéliaux. L'environnement difficile dans les voies aériennes FK forcerait alors les bactéries présentes à se muter pour s'adapter et survivre (68). Ainsi, les bactéries persisteraient dans les voies aériennes sous forme de biofilms, qui sont plus résistants aux antibiotiques, ce qui permettrait à l'infection chronique de s'installer.

### 1.3.3) Les lésions épithéliales et le remodelage tissulaire

#### 1.3.3.1) Atteinte lésionnelle en fibrose kystique

La bronchiectasie est la modification structurale la plus communément observée et décrite dans la pathologie de la FK (voir **Figure 9**). Les dernières études décrivant les autres changements ultrastructuraux des poumons FK remontent déjà à plusieurs années. Ces anciennes analyses révélaient la présence de métaplasie squameuse, d'hyperplasie des cellules caliciformes, d'hyperplasie et d'hypertrophie des glandes sous-muqueuses ainsi que de l'épaississement de l'épithélium (10;101). Plus récemment, d'autres modifications structurales ont été rapportées, comme l'amincissement des parois des voies aériennes FK sur certaines sections, reflétant la dégradation des protéines structurales par l'élastase neutrophilique (voir revues (102;103)). Toutefois, dans d'autres zones, l'épithélium FK semblait plus épais, suggérant des signes de régénération épithéliale. En effet, il a été proposé que les processus de réparation puissent causer l'épaississement de l'épithélium des voies aériennes (102;103).



**Figure 9. Modification ultrastructurale la plus observée : la bronchiectasie.** Schématisation d'une coupe transversale d'une bronche saine et d'une bronche d'un patient FK souffrant de bronchiectasie. (image tirée du site <http://carollissimo.wordpress.com/bronchiectasis/>)

D'autre part, des dépôts fibreux composés de collagène I et III, de ténacine, mais sans microfibrilles associées à l'élastine, auraient été observés sous la lame basale. De plus, il a été suggéré que, dans les voies aériennes FK, le processus fibrotique prédominait sur la fibrogénèse, phénomène normal de la cicatrisation tissulaire (101;104).

La plupart des changements histologiques pourraient être attribués aux cycles d'infection et d'inflammation. Cependant, certaines études indiquent que certaines modifications structurales seraient préexistantes aux premières infections. Il a en effet été suggéré que l'épithélium FK pourrait posséder un défaut structural, peut-être en lien avec les mutations du gène *cfr*. Ces altérations histologiques prénatales pourraient diminuer les fonctions physiologiques et respiratoires des patients FK avant même que la pathologie n'ait commencé à réellement progresser (105). En effet, chez le fœtus FK, une dilatation des glandes sous-muqueuses, une altération de l'épithélium des voies aériennes et une métaplasie de l'épithélium de la trachée auraient été observées (10;26;105;106). Il a été rapporté qu'un remodelage pouvait être détecté dès les premiers mois de vie chez des jeunes patients FK, affectant ainsi la fonction pulmonaire. En effet, chez certains patients, les voies aériennes semblaient déjà dilatées et leur paroi plus épaisse (88;105). De plus, malgré l'absence d'infection pulmonaire, la présence de médiateurs inflammatoires, tels que l'élastase neutrophilique, l'IL-8 ainsi qu'un nombre important de neutrophiles, a été détectée dans le BAL de patients FK au cours de leur première année de vie (26). Ceci semblerait indiquer que la réponse inflammatoire FK n'aurait pas nécessairement besoin d'être précédée d'une infection.

### **1.3.3.2) Origines des lésions épithéliales**

Des lésions épithéliales et un remodelage du tissu épithélial sont présents dans plusieurs pathologies pulmonaires, telles que la FK et l'asthme (102). Les dommages de l'épithélium pourraient être causés par différents éléments, tels que les cytokines, les protéases, le stress oxydatif, ainsi que les facteurs de virulence bactériens.

En FK, le débalancement des cytokines pro- et anti-inflammatoires pourrait causer des lésions épithéliales. Cependant, la contribution directe des cytokines au dommage épithélial n'a pas encore beaucoup été étudiée en FK, contrairement à l'asthme. En effet, dans le cadre d'une étude axée sur cette pathologie, il a été démontré que l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), le TNF- $\alpha$  et

l'IL-1 $\beta$  pourraient causer une dénudation épithéliale, en induisant la nécrose et l'apoptose des cellules épithéliales bronchiques (107). D'autre part, l'IL-6 semble jouer un rôle dans le remodelage de l'épithélium asthmatique via l'activité de la métalloprotéinase-2 (MMP-2) (108). Il a également été démontré que les cytokines IL-4 et IL-13 pouvaient affecter l'intégrité de l'épithélium pulmonaire (109). Enfin, une étude a montré que la surproduction de TNF- $\alpha$  suite à une infection à *S.aureus* pouvait entraîner l'apoptose des cellules causant ainsi des lésions épithéliales pulmonaires (94).

Comme mentionné à la **section 1.3.2.2**, les neutrophiles, recrutés au site de l'agression bactérienne, sécrèteraient de l'élastase, de la collagénase de type I et de type IV, qui pourraient causer des lésions et entraîner du remodelage épithélial (101). En effet, l'analyse des expectorats et de BAL de patients FK, contenant de hautes concentrations de protéines structurales, a permis de confirmer l'importance de la dégradation protéolytique dans les voies aériennes FK (105). L'élastase neutrophilique serait capable de dégrader les protéines structurales des parois des voies aériennes, telles que le collagène, l'élastine et les protéoglycans (78;82;89). De plus, il semblerait que la cathepsine G et l'élastase, des protéases neutrophiliques, détectées dans l'expectorat des patients FK, pouvaient induire le détachement des cellules épithéliales conduisant à la destruction de l'épithélium respiratoire (110).

Le stress oxydatif peut également participer au dommage épithélial, mais son implication directe dans la destruction de l'épithélium des voies aériennes n'a pas encore été bien définie. Cependant, il a été rapporté que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) étaient capables d'inactiver les principaux inhibiteurs de protéases, l' $\alpha$ 1-antitrypsine ( $\alpha$ 1-AT) et l'inhibiteur sécrétoire de la protéase leucocytaire (SLPI), ce qui entraînerait une augmentation démesurée de la concentration de protéases actives dans les voies respiratoires (94). De plus, plusieurs résultats suggèrent que les ROS causeraient la diminution du niveau de glutathion (GSH), le principal antioxydant retrouvé dans le poumon, qui serait associée au dommage tissulaire lié au stress oxydatif (94).

Il a été démontré que l'exposition à *P. aeruginosa*, la bactérie la plus fréquente dans la pathologie de la FK, était capable d'induire des lésions épithéliales (69;100). Plus précisément, les facteurs de virulence, qui sont des exoproduits contribuant à la colonisation et à l'établissement permanent des bactéries, pourraient participer à la destruction tissulaire dans le poumon. En effet, il a été démontré que l'élastase de *P. aeruginosa* pouvait stimuler



l'activité de la MMP-2, qui à son tour dégraderait les protéines de la matrice de l'épithélium respiratoire (96). De plus, cette protéase pourrait aussi affecter l'intégrité épithéliale en dégradant les protéines de jonction ZO-1 et ZO-2 (96). Les autres protéases, telles que la protéase LasA, la protéase LasB, la protéase alcaline et la protéase PASP, seraient capables de cliver le collagène, une composante importante des parois des voies aériennes (98). D'autre part, il a été démontré que la pyocyanine, un des nombreux facteurs de virulence de *P.aeruginosa*, était capable d'induire du stress oxydatif, de la sénescence prématurée ainsi que de l'apoptose dans différents types cellulaires, soit des phénomènes pouvant tous contribuer au dommage épithélial (99;111). Pour ce qui est de la protéine *homoserine lactone C12* associée au biofilm de *P. aeruginosa*, elle dégraderait les jonctions serrées et induirait de l'apoptose dans les cellules des voies aériennes (97).

Tous ces événements pourraient ainsi participer à la destruction progressive de l'épithélium des voies aériennes. Suite à des lésions répétées, au lieu de se réparer normalement, l'épithélium pourrait être graduellement remodelé empêchant malheureusement le rétablissement d'un épithélium fonctionnel.

### **1.3.3.3) Conséquences pathologiques des lésions épithéliales**

L'épithélium des voies aériennes sert de barrière physique face aux agents pathogènes, irritants et/ou polluants de l'environnement. La perturbation de l'intégrité épithéliale pourrait donc entraîner de graves conséquences pour cette première ligne de défense. Par exemple, il a été démontré qu'une infection par le virus respiratoire syncytial (RSV), affectant les jeunes patients FK, pouvait altérer la barrière épithéliale en induisant une diminution des protéines de jonction, telles que la ZO-1, l'occludine, la claudine-1 et la E-cadhérine (112). Une brèche dans l'épithélium, peu importe la cause, permettrait alors l'infiltration de pathogènes, qui pourrait se transformer en infections et inflammation chroniques. En effet, il a été démontré que *P. aeruginosa* possédait une grande affinité pour les composés de la matrice, tels que le collagène I et la fibronectine, qui sont exposés lorsque l'épithélium des voies aériennes est lésé (87). De plus, les dommages causés à l'épithélium pourraient affecter davantage la fonction ciliaire et le transport ionique déjà altérés (113;114). En effet, il a été démontré que l'infection pouvait diminuer la fonction ciliaire due à une perte et à une régénération plus lente des cils ainsi qu'à une altération de la fréquence du battement ciliaire (112). Enfin, la

destruction progressive de l'épithélium des voies aériennes pourrait également entraîner la perte des cellules basales et des cellules de Clara et/ou l'altération des glandes sous-muqueuses, considérées comme des niches de cellules progénitrices, affectant ainsi les processus de régénération de l'épithélium pulmonaire (14;115).

Une autre conséquence des lésions répétées est le changement de structure et d'architecture des voies aériennes FK. Effectivement, le remodelage épithélial serait dû à un déséquilibre de la production et de la dégradation de la matrice extracellulaire. En fait, l'expression ainsi que la sécrétion des MMP et des cytokines seraient dérégulées, entraînant une prolifération excessive des cellules des voies aériennes FK et un prolongement de la réponse inflammatoire (102;116-120). C'est ainsi que l'hyperplasie des cellules caliciformes se développerait progressivement, causant une accumulation excessive de mucus et accentuant l'obstruction des voies aériennes et l'inflammation. Les changements histologiques observés dans les voies aériennes FK, décrits à la **section 1.3.3.1**, surviendraient suite aux dommages multiples de l'épithélium dans un environnement inflammatoire et infectieux (101;121). Plusieurs études rapportent que les médiateurs inflammatoires peuvent causer des lésions épithéliales, participer au développement d'une hyperplasie et/ou métaplasie épithéliale ou même affecter les processus de régénération de l'épithélium des voies aériennes (112). La destruction progressive et le remodelage de l'épithélium des voies aériennes des patients FK peuvent affecter la fonction pulmonaire. Ainsi, de promouvoir les processus de réparation tissulaire, avant le développement d'un remodelage épithélial, devient crucial pour la préservation de l'intégrité et de la fonction épithéliale.

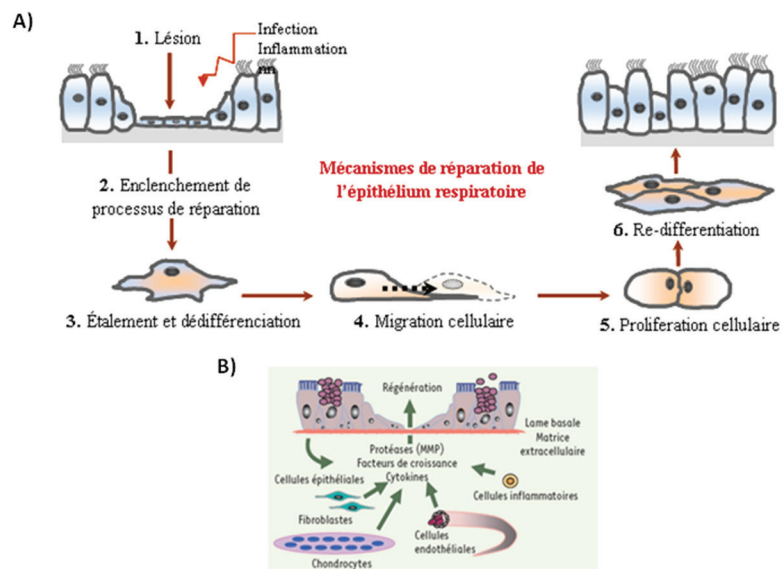
#### **1.3.4) Les processus de réparation épithéliale**

##### **1.3.4.1) Les mécanismes de réparation en condition normale**

Suite aux processus lésionnels, l'épithélium des voies aériennes va tenter de recouvrer son intégrité via une séquence d'évènements (voir **Figure 10**) commençant par l'étalement et la différenciation des cellules, suivi de leur migration vers la région lésée. Les cellules vont alors proliférer pour repeupler la plaie et se redifférencier pour régénérer un épithélium pseudostratifié et fonctionnel (57;122;123).

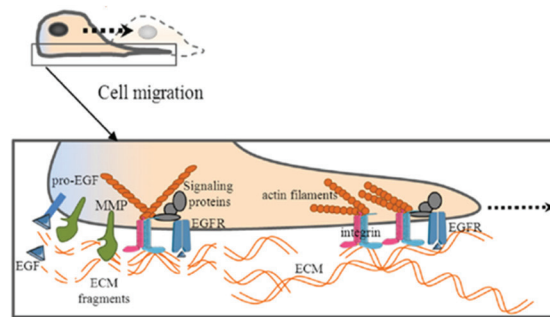
Suite à la lésion, tout commence par la phase de coagulation anti-fibrinolytique. En fait, les cellules endothéliales et épithéliales vont sécréter des médiateurs inflammatoires, qui

vont favoriser la coagulation, permettant ensuite le recrutement de cellules immunes au site de la lésion. Durant la phase inflammatoire qui suit, les monocytes, neutrophiles et macrophages vont non seulement éliminer les débris ainsi que les corps étrangers, mais vont aussi sécréter des cytokines pour favoriser la prolifération cellulaire ainsi que l'angiogenèse. Au même moment, les cellules endothéliales et épithéliales vont sécréter des MMP pour dégrader les tissus résiduels pour faire place à la nouvelle matrice extracellulaire provisoire, qui est indispensable pour la migration des cellules immunes et des fibroblastes (102;124). Toutefois, il est important de souligner que les différentes MMP ne possèdent pas tous les mêmes rôles. En effet, les MMP-2 et MMP-9 inhiberaient la prolifération ainsi que l'adhésion cellulaire, pouvant causer des anomalies dans le processus de régénération épithéliale. Pour ce qui est de la MMP-7, il semble qu'elle puisse favoriser la migration cellulaire en clivant l'ectodomaine de l'E-cadhérine, une protéine importante dans les jonctions cellulaires. Les MMP pourraient stimuler également les processus de réparation via leur contribution au relargage de facteurs de croissance (122).



**Figure 10. Processus de réparation.** **A)** Schématisation des mécanismes séquentiels de la réparation enclenchée suite à une lésion. (schéma adapté et tiré de Bardou et al. *Med Sci* 2009) **B)** Représentation des différents types cellulaires et molécules participant à la régénération épithéliale. (Schéma tiré de Coraux et al. *Med Sci* 2005).

L'étape suivante consiste en la migration des cellules basales pour aller recouvrir la région lésée. Les cellules en bord de plaie vont alors se dédifférencier, s'étendre et s'aplatir afin de former des pseudopodes (57;103;122). La migration cellulaire repose sur une fine régulation de l'activation de différentes voies de signalisation, de l'activité des MMP, du



**Figure 11. Modèle du phénomène de migration cellulaire.** Schématisation des différentes protéines impliquées dans le processus de migration cellulaire. (image adaptée et tirée de Girault et al. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014)

volume cellulaire et/ou du potentiel membranaire (voir **section 1.3.4.2.4**), de la réorganisation du cytosquelette d'actine ainsi que des interactions entre les complexes d'adhésion et la matrice extracellulaire (voir **Figure 11**) (123;125). Ensuite, les niches de cellules progénitrices, principalement les cellules basales, les cellules de Clara et les glandes sous-muqueuses, vont participer à la régénération épithéliale (115;122;126). Après le repeuplement de la région lésée, les cellules épithéliales et les fibroblastes vont proliférer et se redifférencier pour régénérer un épithélium pseudostratifié fonctionnel (57;122;127).

### 1.3.4.2) Les facteurs impliqués dans la régulation de la réparation épithéliale

Plusieurs paramètres pourraient affecter la capacité des cellules épithéliales à rétablir l'intégrité de la région lésée. En effet, l'environnement cellulaire peut affecter non seulement la capacité des cellules épithéliales à migrer, proliférer et à se différencier, mais aussi à interagir avec la matrice ainsi qu'avec les autres cellules. L'environnement cellulaire FK ne semblerait pas propice à une régénération épithéliale normale, comme en dénote les analyses histologiques (103).

#### 1.3.4.2.1) Le rôle des facteurs de croissance dans la réparation épithéliale

Il est reconnu que les facteurs de croissance jouent un rôle important dans les processus de réparation. Les facteurs de croissance au niveau des voies aériennes sont liés/séquestrés dans la matrice extracellulaire via la chaîne latérale des protéoglycans. Lors d'un dommage épithélial, les protéases présentes vont cliver et permettre le relargage des facteurs de croissance directement au site de la lésion. Il a été montré que le *transforming growth factor bêta-1* (TGF- $\beta$ 1), le *hepatocyte growth factor* (HGF) et l'insuline étaient

capables d'induire la synthèse des protéines essentielles pour la matrice extracellulaire (122). Le TGF- $\beta$ 1, le *fibroblast growth factor* (FGF), le *keratinocyte growth factor* (KGF) et l'*epidermal growth factor* (EGF) stimuleraient, quant à eux, la migration cellulaire pour recouvrir la région lésée. L'EGF, le KGF et le *platelet-derived growth factor* (PDGF) favorisent également la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales des voies aériennes (122). Il a aussi été suggéré que certains facteurs de croissance possèdent des propriétés anti-inflammatoires. En effet, le TGF- $\beta$ 1 diminuerait l'activité de NF $\kappa$ B, l'expression d'IL-8 et le recrutement de neutrophiles, alors que le KGF modulerait les effets de l'IFN- $\gamma$ . Cependant, malgré des niveaux élevés de ces facteurs de croissance chez les patients FK, la réponse inflammatoire persiste et la régénération épithéliale ne semble pas suffisante pour rétablir l'intégrité épithéliale (104;122).

#### **1.3.4.2.2) Impact de l'infection sur la réparation épithéliale**

Plusieurs études ont démontré que l'infection pouvait interférer dans les processus de régénération épithéliale. En effet, il a été confirmé que la présence de bactéries pouvait nuire aux processus de réparation (69;77). Par exemple, une étude sur l'épithélium cutané montrait que les protéases bactériennes pouvaient dégrader les facteurs de croissance ainsi que leurs récepteurs (77). Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* pouvaient également altérer la régénération épithéliale. En effet, l'exoT, une protéine activatrice des GTPases de la famille Rho, affecterait les processus de réparation en interférant dans la formation des adhésions focales et en altérant le cytosquelette d'actine des cellules (95). Il semble aussi que l'élastase et l'exoS pourraient diminuer les fibres de stress et empêcher la polymérisation des filaments d'actine dans les cellules en migration (96). Il a été rapporté que l'exotoxine exoA affecterait le rétablissement des jonctions serrées en diminuant l'expression des protéines ZO-1 et ZO-2, ce qui empêcherait le rétablissement de l'intégrité de l'épithélium pulmonaire (96).

Cependant, certaines études ont suggéré que la réparation épithéliale pouvait être stimulée en réaction à la présence d'infection. Le LPS de *P. aeruginosa*, par exemple, stimulerait les processus de réparation dans les cellules des voies aériennes, via l'activation de la voie de l'EGF/EGFR (128;129). Enfin, les produits bactériens de *S. aureus* pourraient non seulement augmenter la prolifération et la survie cellulaire, mais favoriserait également la

réparation épithéliale (130). Ces résultats démontrent que l'impact de l'infection sur les processus de réparation est encore mal compris et mérite d'être étudié plus finement.

#### **1.3.4.2.3) Le rôle de l'inflammation dans la réparation épithéliale**

Le remodelage épithélial semblerait être une conséquence de la réponse inflammatoire. En effet, il a souvent été rapporté que le remodelage des voies aériennes était observé dans des pathologies inflammatoires, telles que la FK ou l'asthme (102;131). En effet, dans le cadre de l'asthme, l'IL-9 pourrait induire l'hyperplasie des cellules caliciformes durant la régénération épithéliale (121). De plus, plusieurs cytokines, telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et l'IL-21, posséderaient des propriétés pro-fibrotiques (124). Il a aussi été démontré que l'IL-1 $\beta$  favorisait la fibrose en empêchant le processus de fibrogénèse dans l'épithélium alvéolaire (132). À l'inverse, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12 possèdent des propriétés anti-fibrotiques. En fait, un traitement à l'IFN- $\gamma$  et à IL-12 induirait une diminution du dépôt de collagène dans des modèles de souris traitées à la bléomycine développant de la fibrose (124). D'autre part, l'IL-13 semble stimuler la prolifération cellulaire via l'activation de TGF- $\alpha$  et favoriser la réparation des cellules épithéliales des voies aériennes par l'activation de la voie du HB-EGF (133;134). Il a également été rapporté que l'IL-13 favorisait la sécrétion de facteurs de croissance (122).

Cependant, les études montrent que les médiateurs inflammatoires pourraient avoir des effets opposés dans les processus de réparation. En effet, il a été démontré que le TNF- $\alpha$  pouvait stimuler la prolifération des hépatocytes et de cellules épithéliales mammaires (135;136). Dans une étude de notre laboratoire explorant les effets du TNF- $\alpha$  sur les processus de réparation, nous avons démontré que cette cytokine pro-inflammatoire inhibait la prolifération des cellules humaines bronchiques saines (NuLi-1) et FK (CuFi-1) (137). Nos travaux ont montré qu'à l'inverse le TNF- $\alpha$  stimulait la migration et la réparation épithéliale des 2 types cellulaires par une transactivation de la voie EGF/EGFR. En fait, l'impact direct de la réponse inflammatoire excessive observée en FK sur les processus de réparation n'a pas beaucoup été étudié, mais il apparaît évident que les effets de l'inflammation sur ces phénomènes peuvent être très complexes.

#### **1.3.4.2.4) Le rôle des canaux ioniques dans la réparation épithéliale**

Plusieurs études ont démontré que les canaux ioniques participent à la régulation des mécanismes de réparation épithéliale (123;125). Une des premières étapes est la migration des cellules vers la région lésée. Selon l'équipe du D<sup>r</sup> Schwab, la migration cellulaire pourrait être décrite comme des phases répétées et coordonnées de protrusion du lamellipode et la rétractation du corps de la cellule (125). Leur modèle proposait l'implication de différents mécanismes de transport, tels que les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , les co-transporteurs  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$  et  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ , les canaux  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  mécano-sensibles, le canal ENaC, les canaux  $\text{K}^+$  ainsi que les aquaporines, combiné à la modulation des protéines du cytosquelette d'actine et des interactions avec la matrice extracellulaire (125).

Après que les cellules aient recouvert la région lésée, elles doivent ensuite proliférer, une étape importante qui est également régulée, en partie, par les canaux ioniques (138-140). La dernière étape de la réparation épithéliale fait appel à une différenciation cellulaire, permettant le rétablissement d'un épithélium fonctionnel (141-143). Bien que le rôle du transport ionique ait très peu été étudié au niveau de la différenciation cellulaire de l'épithélium pulmonaire, certaines évidences indiquent que les canaux  $\text{K}^+$  pourraient également y participer (123). Ainsi, les canaux ioniques et les différents mécanismes de transport seulement impliqués à toutes les étapes de la réparation épithéliale.

##### **1.3.4.2.4.1) Le rôle des canaux $\text{K}^+$ dans la réparation épithéliale**

Beaucoup de groupes ont étudié l'implication des canaux  $\text{K}^+$  dans la réparation épithéliale. En effet, comme détaillé dans la revue de Girault *et al.*, les canaux  $\text{K}^+$  participeraient à ces processus en contrôlant notamment le volume cellulaire, le potentiel membranaire et la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Les canaux  $\text{K}^+$  interagiraient également avec les intégrines, impliquées dans les phénomènes d'adhésion/désadhésion durant le mouvement de la cellule, et réguleraient l'expression des cyclines, qui sont essentielles à la progression du cycle cellulaire. Ces canaux réguleraient même le relargage des facteurs de croissance (123).

Le rôle des canaux  $\text{K}^+$  dans la migration cellulaire a été maintes fois démontré. Par exemple, l'inhibition du courant et de l'expression du canal Kv1.1 dans les cellules épithéliales intestinales de rat réduirait leur capacité à migrer suite à une lésion (144). Il a été

rapporté, dans une revue de Schwab *et al.*, que le canal KCa3.1 pouvait moduler la migration de plusieurs types cellulaires différents (125), comme les cellules MDCK (145;146) ou les mastocytes pulmonaires (147). Au niveau de l'épithélium alvéolaire et bronchique, j'ai, au sein de l'équipe du D<sup>r</sup>e Brochiero, démontré que les canaux KvLQT1, K<sub>ATP</sub> et KCa3.1 jouaient un rôle crucial dans la migration cellulaire et dans les processus de réparation (148;149).

L'activation des canaux K<sup>+</sup> pourrait entraîner un influx de Ca<sup>2+</sup> essentiel à la migration cellulaire (123). L'activation des canaux Kv1.1 et Kv1.5, par exemple, permettant l'hyperpolarisation des cellules intestinales et un influx de Ca<sup>2+</sup> (150;151), favoriserait la réépithélisation. Wang *et al.* ont aussi montré qu'une régulation à la hausse des canaux Kv permettait une hyperpolarisation membranaire, induisant un influx de Ca<sup>2+</sup>, qui favoriserait la migration cellulaire (144). En effet, la revue de Schwab *et al.* rapporte que l'activation de plusieurs protéines de la machinerie migratoire, telles que la myosine II, les calpaïnes, la protéine kinase dépendante de la calmoduline/Ca<sup>2+</sup>, les intégrines et même certains transports ioniques, dépendaient du signal calcique (125).

Les canaux K<sup>+</sup> sembleraient également moduler l'adhésion cellulaire et la migration médiées par les intégrines. En fait, comme rapporté dans la revue de Girault *et al.*, l'activation des intégrines-β1 et -β3 pourrait augmenter les courants hERG et BK<sub>ca</sub> (123). Réciproquement, les canaux K<sup>+</sup> peuvent interagir directement avec les intégrines et moduler leur activité (151-153). Il a même été suggéré qu'un changement de la concentration extracellulaire de K<sup>+</sup>, du potentiel membranaire ou de l'activité des canaux K<sup>+</sup> pouvait induire une variation du pH, modifiant ensuite la fonction des intégrines (123).

Plusieurs études ont souligné l'importance de l'activité des canaux K<sup>+</sup> durant le processus prolifératif (123). Il a en effet été démontré que les canaux K<sup>+</sup> pouvaient participer à la prolifération cellulaire induite par l'EGF dans différents types cellulaires (138;154). J'ai montré, durant ma maîtrise, que l'activité des canaux KvLQT1 et K<sub>ATP</sub> modulait la prolifération des cellules épithéliales alvéolaires stimulée à l'EGF, alors que la fonction des canaux KvLQT1, K<sub>ATP</sub> et KCa3.1 régulaït celle des cellules bronchiques saines et FK (148;149). Dans des cellules épithéliales rénales, il a été démontré que les canaux K<sup>+</sup> pouvaient induire le relargage de facteurs de croissance, qui moduleraient à leur tour la prolifération cellulaire (155). La prolifération cellulaire pourrait également être régulée par une variation du volume cellulaire, suite à des changements de flux ioniques (140;156-158).



En fait, la variation du volume cellulaire module l'expression et/ou l'activité des protéines du cycle cellulaire (139). En effet, il a été démontré que l'activité des canaux  $K^+$  régulait l'expression des cyclines impliquées dans la progression du cycle cellulaire (138;159). D'autre part, l'efflux de  $K^+$ , induisant une hyperpolarisation de la membrane cellulaire, étape cruciale dans la progression du cycle cellulaire (138;140;158;160-163). Cette hyperpolarisation de la membrane permettrait un influx de  $Ca^{2+}$  pour la transition entre les différentes phases du cycle cellulaire ou constituerait un signal intracellulaire pour l'activation des voies de signalisation impliquées dans la mitogenèse (158;163-165). Cependant, il a été rapporté que la conductance des canaux TASK3 et TREK-1 pouvait réguler la prolifération des cellules HEK293, alors que l'expression du canal EAG, et non son activité, pouvait moduler celle des cellules de gliomes C6 (139;163). Il n'a donc pas été encore clairement défini si les propriétés de conductance des canaux, ou les protéines canal en tant que telles, étaient responsables de la régulation de la prolifération cellulaire.

Puisque plusieurs types de canaux  $K^+$  sont exprimés dans un même tissu (plus de 30 différents par exemple au niveau du poumon (57)), il se pourrait que leurs rôles soient complémentaires ou redondants. Ainsi, définir clairement l'implication de chaque type de canal dans les différents phénomènes cellulaires, menant à la réparation/régénération épithéliale, pourrait s'avérer complexe (123). Cependant, il semble de plus en plus évident que les canaux  $K^+$  font partie des nombreux facteurs impliqués dans les processus de réparation pour permettre le rétablissement de l'intégrité et la fonctionnalité de la barrière épithéliale.

#### **1.3.4.2.4.2) Le rôle des canaux CFTR dans la réparation épithéliale**

D'autres transports ioniques pourraient aussi moduler les mécanismes de réparation. En effet, il a été rapporté que les canaux  $Cl^-$  pouvaient participer au processus migratoire des cellules HeLa et des monocytes (150;166). Récemment, il a été démontré que la migration et la prolifération des cellules bronchiques humaines pouvaient aussi dépendre de l'activité de ANO1, un canal  $Cl^-$  activé par le  $Ca^{2+}$  (167). De plus, les canaux  $Cl^-$  pourraient également moduler la prolifération via la progression du cycle cellulaire ou l'activation de différentes voies de signalisation (156;168-170).

Au moment où j'ai débuté mes travaux de doctorat, aucune étude n'avait encore exploré le rôle du canal  $Cl^-$  CFTR dans les processus de réparation. En 2010, Schiller *et al.* ont

alors montré que l'inhibition du CFTR ou son extinction par des shRNA affectait la capacité de réparation des monocouches de cellules séreuses Calu-3 (171). Les auteurs ont aussi démontré que le CFTR pouvait participer à la migration cellulaire en modulant la formation des lamellipodes à l'avant de la cellule en mouvement. Cette étude constitue une des premières évidences de la participation directe du CFTR aux processus de réparation épithéliale des voies aériennes (171) et a fait l'objet d'un éditorial qui explore l'implication du canal CFTR dans les processus de réparation (172). Il a ensuite été rapporté que le canal CFTR serait capable de générer des courants ioniques guidant et orientant les cellules de trachée de singe rhésus vers la plaie (173). Les auteurs ont observé que l'épithélium pouvait générer un champ électrique qui s'étend de l'épithélium intact à celui qui est lésé. Ce phénomène amènerait les cellules à se déplacer vers la région lésée. Enfin, il semblerait que le CFTR modulerait également la migration et la réparation des cellules trophoblastiques BeWo (174). Mes travaux, présentés au chapitre 3, ont donc contribué à mieux comprendre le rôle du CFTR dans les processus de réparation, grâce à des modèles de cellules humaines primaires des voies aériennes non-FK et FK.

### **1.3.5) Les processus de réparation en fibrose kystique**

Comme mentionné à la **section 1.3.3.1**, l'analyse histologique de poumons collectés chez des patients FK révèle des sections montrant des signes de réparation, suggérant que l'épithélium FK tente, malgré un environnement difficile, de se réparer (102;103). Toutefois, il semble qu'au niveau des voies aériennes FK, les processus lésionnels prennent le dessus aux dépens des processus de réparation et de régénération épithéliale. Par un modèle de xéno greffe mimant les étapes de régénération d'un épithélium différencié, l'équipe du Dr<sup>re</sup> Coraux a montré pour la première fois que l'épithélium FK présentait un défaut de base de régénération. En effet, leurs travaux ont démontré que la régénération d'un épithélium à partir de cellules primaires collectées des voies aériennes de patients FK était anormale et plus lente que celle observée à partir de cellules non-FK (116). Leur analyse histologique a souligné une prolifération plus importante dans les greffons FK, résultant en un épithélium plus épais, une hyperplasie des cellules basales et un retard de différenciation. Il a été proposé que ce défaut de régénération épithéliale puisse être dû par un dérèglement impliquant l'IL-8, les MMP-7 et MMP-9 ainsi que leur inhibiteur TIMP-1. De façon similaire, mes travaux de maîtrise dans le

laboratoire du D<sup>re</sup> Brochiero ont démontré un retard de réparation des monocouches de cellules humaines bronchiques FK CuFi-1, comparativement aux cellules non-FK NuLi-1(149). Enfin, tel qu'expliqué à la section précédente, l'implication du CFTR dans la formation des lamellipodes dans les cellules Calu-3 durant le processus migratoire suggère que ce processus de réparation puisse être altérée dans la pathologie de la FK, où le canal est dysfonctionnel ou absent (171).

En résumé, plusieurs évidences indiquent que les processus de réparation de l'épithélium des voies aériennes FK sont altérés. Cependant, aucune de ces études n'aborde directement ce possible défaut de réparation de l'épithélium FK. En effet, dans notre étude de 2008, les expériences avaient été effectuées sur des lignées cellulaires avec des profils génétiques différents, i.e. les lignées NuLi-1 et CuFi-1 sont issues de 2 patients d'âge et de sexe différents (175). Ces facteurs pourraient donc avoir influencé et/ou affecté nos résultats. D'autre part, l'étude de Schiller *et al.* portait sur les cellules Calu-3 (171), qui sont dérivées de cellules séreuses, et non des cellules épithéliales. Dans le cas du modèle de xénogreffe (116), la formation d'un épithélium différencié se rapprocherait plus de la réalité, mais constitue une phase beaucoup plus tardive de la réparation épithéliale. De plus, les phénomènes observés dans ce modèle ne font pas suite à des processus lésionnels. Ainsi, il nous a semblé important de vérifier et confirmer l'existence de ce défaut de réparation à l'aide de modèle de cellules humaines primaires FK.

#### **1.4) Thérapies et traitements en fibrose kystique**

Au cours des dernières décennies, plusieurs thérapies ont été développées afin de traiter le défaut primaire du CFTR et/ou les symptômes de la maladie. En effet, plusieurs équipes se sont dévouées à mettre au point une thérapie génique, qui permettrait l'insertion d'un CFTR fonctionnel dans les cellules des patients FK (176-178). Certains groupes ont tenté de contourner le problème de sécrétion de Cl<sup>-</sup> et de fluide via la réhydratation des voies aériennes ou la modulation de transports ioniques alternatifs pour tenter de rétablir les conditions optimales pour la clairance mucociliaire (7;8;179). De nombreux efforts ont été déployés également pour mettre au point des antibiotiques et des anti-inflammatoires destinés à stabiliser l'état des patients (7;89;92). Cependant, de nouvelles approches visent maintenant

à cibler les altérations spécifiques de chaque classe de mutations. Toutes ces stratégies sont décrites ci-dessous.

#### 1.4.1) La thérapie génique

La thérapie génique dans le cadre de la pathologie de la FK vise à corriger le défaut de base, c'est-à-dire réinsérer le gène d'un CFTR fonctionnel dans les cellules FK. Malheureusement, les équipes de recherche se sont butées à plusieurs obstacles lors du processus de transfection du gène dans les cellules humaines, tels que l'accès au vecteur difficile et limité à travers le mucus recouvrant les voies aériennes FK, la spécificité et la stabilité de la thérapie ainsi que la taille du gène (27 exons) à insérer. Au départ, il avait été entrepris, afin de contourner le problème de la taille du gène, d'utiliser un adénovirus pour distribuer le gène de CFTR dans les tissus touchés par la maladie (voir **section 1.1**), spécialement au niveau des voies aériennes. Toutefois, après l'incident de Jesse Gelsinger, qui est décédé, en 1999, suite à une réaction immunitaire sévère dans le cadre d'un essai clinique de thérapie génique utilisant un adénovirus, certaines études, dont celle de parrainée par la *Cystic Fibrosis Foundation* aux États-Unis, ont été suspendues par la *Food and Drug Administration* (FDA) (180;181). Dans les années qui suivirent, les équipes, devenues plus prudentes, se sont tournées vers les vecteurs de virus adéno-associés (AAV) qui sont théoriquement moins pathogènes, puisqu'ils ne peuvent pas se répliquer seuls (2;30;176;177;182).

Par la suite, pour éviter le plus possible des problèmes de réaction immunitaire, un lipide cationique (vecteur non-viral) couplé à un plasmide *CFTR pDNA* a été utilisé en remplacement et a entraîné des effets bénéfiques chez les patients FK, tels qu'une diminution des cellules inflammatoires et de l'adhérence bactérienne dans les expectorats et des brossages bronchiques ainsi qu'une amélioration de la différence de potentiel trans-épithélial nasal (PD). Cependant, cette ancienne génération de plasmides pouvait encore induire une réponse immunitaire. Ainsi, le nouveau plasmide pGM169 contenant le gène de CFTR a été créé. Les premiers tests avec le pGM169 couplé au lipide cationique GL67 seraient encourageants et n'entraîneraient pas d'effets cytotoxiques. Ce nouveau vecteur fait maintenant partie d'une étude de 3 ans, qui a débuté en juin 2012, sur une population plus large pour vérifier l'efficacité de cette nouvelle thérapie (183). Stern *et al.* ont suggéré que l'application d'agents

mucolytiques (voir **section 1.4.5.3**) pouvait améliorer l'accès au vecteur et par le fait même, l'efficacité de cette thérapie (184).

## **1.4.2) Les antibiothérapies**

### **1.4.2.1) Les macrolides**

Plusieurs antibiotiques ont été développés afin de tenter d'enrayer la colonisation et l'infection bactérienne. Les macrolides, tels que l'azithromycine, seraient capables d'inhiber les facteurs de virulence des bactéries, diminuant ainsi l'adhérence de *P. aeruginosa* et la formation de biofilms (185). En plus de leurs propriétés anti-bactériennes, les macrolides pourraient diminuer la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-8 (92) ainsi que la viscosité de la couche de mucus et les dommages tissulaires causés par les neutrophiles (185). Bien qu'ils permettent une petite amélioration de la fonction pulmonaire et diminuent les exacerbations, leur utilisation à long terme a malheureusement été associée à une perte auditive et des problèmes cardiaques (92;185;186).

### **1.4.2.2) Les antibiotiques contre *P. aeruginosa***

Il existe des antibiotiques nébulisés, visant directement *P. aeruginosa*, qui ont l'avantage de pouvoir être administrés à haute concentration permettant une activité maximale sans causer de toxicité systémique. La tobramycine en poudre, la levofloxacine et l'amikacine peuvent améliorer la fonction respiratoire et diminuer la densité de *P. aeruginosa* dans l'expectorat des patients FK (7). La levofloxacine diminuerait la multiplication des bactéries en inhibant l'enzyme bactérienne topoisomérase IV, alors que l'amikacine interférerait dans la biosynthèse des protéines impliquées dans la croissance bactérienne. Sous forme de liposomes, l'amikacine pourrait pénétrer les biofilms bactériens, lui donnant 2 avantages par rapport aux antibiotiques nébulisés : 1) un accès direct aux bactéries et 2) une libération prolongée de l'antibiotique (7).

Il existe également des thérapies ciblant le système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa*. Ce système, par lequel la bactérie implante ses protéines effectrices (ExoS, ExoT, ExoU et ExoY) directement dans le cytoplasme de la cellule pour moduler et contrôler à son avantage les mécanismes cellulaires, contribue à la sévérité de ces infections (187). En effet, le KB001-A, qui bloque le fonctionnement du système de sécrétion de type III, permettrait la

diminution de la concentration de la myéloperoxidase, de l'élastase, de l'IL-1, de l'IL-8 et du recrutement des neutrophiles. En plus de ses propriétés anti-bactériennes, le KB001-A réduirait la réponse inflammatoire et le dommage tissulaire au niveau des voies aériennes FK (7).

#### **1.4.2.3) Les antibiotiques ciblant les autres bactéries**

Pour une infection au SARM, qui est un pathogène émergent en FK, un traitement au chlorhydrate de vancomycine en poudre a été développé. Un essai clinique est présentement en cours afin de vérifier l'efficacité et l'innocuité de ce nouveau composé (7). De plus, une nouvelle combinaison d'antibiotiques en inhalation à large spectre a été développée. Il s'agit d'un traitement combinant la fosfomycine/tobramycine, ciblant les bactéries gram-positives et -négatives, qui permettrait une amélioration substantielle de la fonction pulmonaire chez les patients FK (7).

#### **1.4.3) Les thérapies anti-inflammatoires**

Pour remédier à l'hyper-inflammation décrite en FK, plusieurs thérapies anti-inflammatoires ont été développées pour intervenir à chaque phase de la réponse inflammatoire. Les corticostéroïdes induiraient une diminution de la production de mucus, limiterait l'œdème et le recrutement, l'adhésion ainsi que l'activation des leucocytes au site infecté et réduirait la réponse inflammatoire en interférant dans l'activation de la voie de NFκB (89;186). D'autre part, les inhibiteurs de la 5-lipoxygénase réduiraient la production du leucotriène LTB<sub>4</sub>, un important chemoattractant des macrophages et des neutrophiles et limiteraient ainsi l'inflammation (89;186). L'ibuprofène, un anti-inflammatoire non-stéroïdien réduirait, à forte dose, le recrutement et/ou l'activité des neutrophiles et améliorerait la clairance mucociliaire (92;188). Il modulerait également l'expression et l'activité, entre autres, de NFκB, AP-1, IKKβ et MAPK, qui sont associées au déclenchement de la réponse inflammatoire (89;92;186;188). Enfin, l'utilisation d'un anticorps neutralisant de l'IL-8 permettrait de réduire le recrutement des neutrophiles, alors que des thérapies contre l'IFN-γ et/ou le TNF-α bloqueraient les voies menant à la production d'IL-8 et à l'activation de NFκB (78;89;91;186;188).

#### **1.4.4) Les thérapies anti-protéasiques**

Les thérapies anti-protéasiques pourraient devenir une option intéressante pour neutraliser les différentes protéases neutrophiliques et bactériennes présentes dans les voies aériennes FK. Elles empêcheraient la formation de biofilms bactériens et réguleraient la réponse inflammatoire (7). L' $\alpha$ 1-antitrypsine est le principal inhibiteur de l'élastase neutrophilique, mais elle serait inactivée par le stress oxydatif et par le clivage protéolytique, la rendant ainsi inefficace. Malheureusement, les traitements à l' $\alpha$ 1-antitrypsine nébulisée n'a permis d'obtenir que des effets limités sur l'activité de l'élastase et des autres marqueurs inflammatoires (7). Il a donc été suggéré que ce traitement pourrait être efficace uniquement chez les patients FK dont l'état n'est pas encore trop avancé (89;186;189).

#### **1.4.5) Les thérapies favorisant l'hydratation de l'ASL**

##### **1.4.5.1) Solution hypertonique et mannitol**

Certains traitements ont été développés pour favoriser l'hydratation de l'ASL et pour aider à fluidifier l'épaisse couche de mucus pour tenter de rétablir le processus de clairance mucociliaire. L'administration de solution saline hypertonique ou de mannitol en poudre induirait un gradient osmotique qui permettrait un influx d'eau au niveau des voies aériennes (8;179). Cependant, certains risques, tels que la toux, des bronchospasmes et une diminution de la fonction respiratoire, ont été associés à l'inhalation du mannitol (7;8;179).

##### **1.4.5.2) La modulation du transport ionique**

La modulation des canaux ioniques alternatifs a été proposée afin de contourner le défaut de CFTR. L'inhibition du canal ENaC par le 552-02 ou le camostat permet d'améliorer la clairance mucociliaire (8;190); cependant, l'action bénéfique de ces composés n'est que de courte durée. L'activation des canaux Cl<sup>-</sup> alternatifs au CFTR, tels que les canaux Cl<sup>-</sup> activés par le Ca<sup>2+</sup> (CaCC), par les agonistes des récepteurs P2Y<sub>2</sub>, pourrait également aider à réhydrater l'ASL. Par exemple, le Moli-1901 stimule la sécrétion de Cl<sup>-</sup>, mais causerait malheureusement à forte concentration une perte de l'intégrité cellulaire (8). En outre, le Denufosol tetrasodium, un autre agoniste des récepteurs P2Y<sub>2</sub>, mais qui inhiberait également l'activité de ENaC, permettrait l'augmentation du battement ciliaire, du mouvement du mucus et de la fonction pulmonaire, est présentement en étude clinique de phase 3 (8;18;190).

### **1.4.5.3) Les agents mucolytiques**

Des molécules possédant une activité mucolytique ont été développées pour aider à fluidifier la couche de mucus déshydratée et visqueuse recouvrant l'épithélium FK. La désoxyribonucléase humaine I recombinante est utilisée pour cliver et fragmenter l'ADN des débris cellulaires et bactériens (2;18;186). L'agent mucolytique N-acétylcystéine modulerait également l'inflammation, mais il pourrait causer des irritations dans les voies aériennes des patients (89;90). L'antioxydant GSH posséderait aussi des propriétés mucolytiques, puisqu'il est capable de briser les ponts disulfures reliant les mucines, réduisant ainsi la viscosité du mucus. Cependant, il semblerait qu'il perde malheureusement ses propriétés antioxydantes lorsqu'il est administré en aérosol (90).

### **1.4.6) La transplantation pulmonaire**

Pour les patients FK dont la maladie est trop avancée avec une fonction respiratoire trop détériorée, la transplantation pulmonaire devient alors leur dernière option de survie. Toutefois, cette chirurgie peut amener plusieurs complications et il existe le risque de rejet aiguë ou chronique. De plus, la transplantation pulmonaire n'est pas nécessairement une solution permanente. Elle n'améliore pas les fonctions altérées des autres organes touchés, tels que le pancréas, le foie ou l'intestin grêle.

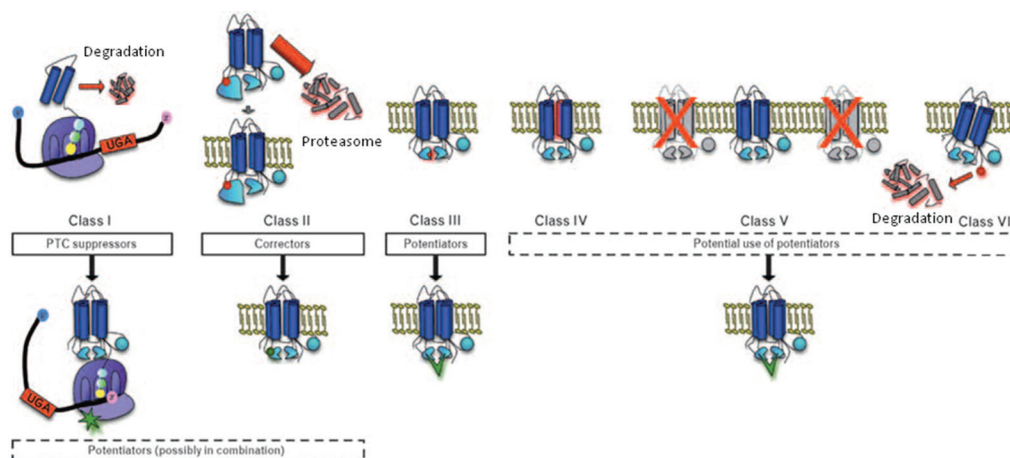
### **1.4.7) Les thérapies adaptées aux classes de mutations**

#### **1.4.7.1) Thérapies pour les mutations de classe I**

Les mutations non-sens représentent 5 à 10% des mutations rencontrées chez les patients FK. Des composés ont été développés pour permettre la translecture des codons stop prématurés (voir **Figure 12**) (8;30;37;182). Un composé prometteur est l'Ataluren, qui agirait en se fixant au ribosome et en induisant, malgré la présence d'un codon stop, l'incorporation d'un acide aminé, permettant la traduction de la protéine au complet (37;190;191). Bien qu'il n'induisse pas de changement de la concentration de sel dans la sueur, il permettrait toutefois une augmentation significative du PD, une autre mesure indirecte de la fonction de CFTR (7). Cependant, selon une étude clinique qui s'est terminée en 2012, l'efficacité de l'Ataluren pourrait être affectée lorsqu'il était administré avec des antibiotiques en inhalation (192).



D'autres tests cliniques sont à prévoir afin de confirmer ces résultats et déterminer si l'Ataluren demeure un traitement adéquat pour les mutations de la classe I.



**Figure 12. Thérapies adaptées aux classes de mutation.** Représentation schématique de chacune des classes de mutations et les types de thérapies qui y sont adaptées. (image tirée de Sloane et al. *Curr Opin Pulm Med* 2010)

### 1.4.7.2) Thérapies adaptées aux mutations de classe III

Dans cette classe de mutations, le canal CFTR muté se retrouve à la membrane, mais présente un défaut d'activation ou possède une fonction de canal  $\text{Cl}^-$  anormale. Les potentiators, qui permettraient donc l'augmentation de l'activité du canal CFTR, sont des composés qui ont été développés spécialement pour cette classe. Il a toutefois été suggéré que ces molécules pourraient également être efficaces dans les classes de mutation IV, où la conductance est altérée ainsi que dans les classes V et VI, où le nombre canaux actifs est réduit (voir **Figure 12**) (37). Il semblerait que les potentiators puissent agir par différents mécanismes d'action. Certains de ces composés augmenteraient la concentration d'AMPc cytosolique pour favoriser la phosphorylation du canal ou pourraient inhiber les phosphatases pour empêcher la déphosphorylation de celui-ci. D'autres composés pourraient également induire l'activation du canal par des interactions directes (24;190;193).

Il existe plusieurs potentiators, tels que le benzimidazolone et la génistéine, qui agiraient par le même mécanisme. Ils inhiberaient l'hydrolyse de l'ATP, stabilisant ainsi l'état ouvert du canal (24;194). D'autre part, la phloxine B lierait directement le CFTR et prolongerait l'ouverture du canal (24;195). Enfin, il a été démontré que l'activateur GPact-11a augmenterait le courant  $\text{Cl}^-$  via le CFTR dans différentes lignées cellulaires et divers modèles *ex vivo* (24;196).

Dans les expériences *in vitro*, le potentiateur VX-770 (ou Ivacaftor) favoriserait la sécrétion de Cl<sup>-</sup> et augmenterait la probabilité d'ouverture du canal (191;197). Durant les essais cliniques sur des patients G551D, il a été démontré que ce composé diminuait la concentration de sel dans la sueur, améliorait le PD et la fonction respiratoire, et finalement, favorisait un gain de poids. Ainsi, le VX-770 permettrait une amélioration de la qualité de vie des patients FK et constitue la première thérapie disponible traitant directement le défaut de base du CFTR (8;198;199).

Il a été démontré que le VX-770 pouvait non seulement être efficace pour la mutation G551D, mais aussi pour d'autres mutations de la classe III similaires à G551D, ainsi que la mutation R117H de la classe IV. Une autre étude clinique de phase II a testé l'efficacité du VX-770 sur les patients homozygotes  $\Delta$ F508. Comme attendu, un faible niveau d'expression du CFTR à la membrane aurait été détecté, mais aucune amélioration des paramètres cliniques n'a été observée (7).

Il a aussi été rapporté que de fortes doses de potentiateurs pouvaient inhiber l'activité du canal CFTR. En effet, ceux-ci se fixeraient à deux sites différents au niveau des NBD, soit à un site «activateur» et/ou à un site «inhibiteur». Cette interaction serait en plus dépendante du pH cytosolique, qui deviendrait plus acide durant les phases d'infection et d'inflammation. Ces évidences révèlent que l'efficacité des potentiateurs pourrait être altérée dans les voies aériennes infectées et enflammées des patients FK (193).

#### **1.4.7.3) Thérapies adaptée aux mutations de classe II**

Dans le but de rétablir une expression du canal CFTR à la membrane, des correcteurs ont été développés afin de favoriser la maturation partielle des protéines mal repliées (mutations de classe II) (voir **Figure 12**). En fait, ces petites molécules permettraient au CFTR- $\Delta$ F508 d'échapper à la machinerie cellulaire et à la dégradation par ERAD (*ER-associated degradation*) (37;52;79;200). Bien que l'exposition aux correcteurs induise une expression membranaire du CFTR- $\Delta$ F508, son activité ainsi que sa demi-vie resteraient toutefois grandement réduites comparativement à un canal CFTR normal (201-203). Malgré une efficacité limitée de ces composés, ils demeuraient quand même une approche intéressante, puisqu'une récupération de seulement 5 à 10% de l'expression totale de CFTR pourrait être suffisante afin d'améliorer les symptômes des patients FK et leur fonction respiratoire

(79;200;201). Les correcteurs de CFTR, qui ont été développés, sont classés en 2 catégories : les chaperonnes chimiques et les chaperonnes pharmacologiques, comme décrit ci-dessous.

#### **1.4.7.3.1) Les chaperonnes chimiques**

Les chaperonnes chimiques, sans se fixer directement sur le CFTR mutant, seraient capables de stabiliser la protéine durant son repliement (201). Par le passé, les osmolytes, empêchant l'agrégation des domaines du CFTR partiellement repliés, semblaient donc être des molécules intéressantes. Le 4-phenylbutyrate, un inhibiteur d'histone déacétylase, ainsi que le curcumin ou la thapsigargine, inhibiteurs des Ca<sup>2+</sup>-ATPases du réticulum sarcoplasmique, font partie de ces molécules. Cependant, l'action des osmolytes n'était pas spécifique au CFTR mal replié, ce qui pouvait affecter d'autres voies métaboliques. De plus, leur seuil thérapeutique était relativement élevé (200;201;204).

#### **1.4.7.3.2) Les chaperonnes pharmacologiques**

Les chaperonnes pharmacologiques permettraient le repliement et la maturation du CFTR muté hors du réticulum endoplasmique, soit par interaction directe, soit par la régulation des protéines impliquées dans les processus de maturation/dégradation du CFTR (55;190).

Le Corr-2b, le Corr-4a, le VRT-532 et le VRT-325 font partie de la première génération de correcteurs à avoir été développée. Il a été démontré qu'ils étaient efficaces pour restaurer un courant Cl<sup>-</sup> activé par l'AMPC. Il semblerait qu'ils interagiraient directement avec le CFTR muté et favoriseraient l'assemblage des TM et des MSD (201;204). En effet, il a été rapporté que la fixation du Corr-4a sur le CFTR muté pouvait moduler l'interaction entre certains segments de la protéine permettant le bon repliement des MSD (52;205). Toutefois, dépendamment du type cellulaire, d'autres mécanismes d'action ont également été identifiés pour ce correcteur. En effet, il a été démontré, dans un cas, que le Corr-4a se lierait au CFTR muté et empêcherait ainsi l'interaction de celui-ci avec la chaperonne Hsc70, protéine importante dans la machinerie de dégradation du CFTR (206). Ceci entraînerait alors un changement allostérique du NBD1 favorisant son repliement évitant ainsi la dégradation. Dans une autre étude, il a plutôt été proposé que le Corr-4a était capable d'inhiber la cascade E1-E3

régulant le processus d'ubiquitination des protéines destinées à la dégradation, dont le CFTR- $\Delta$ F508 (200).

Le correcteur VRT-325, que nous avons utilisé dans nos études, favoriserait les interactions entre les MSD, permettant ainsi un meilleur assemblage des segments transmembranaires (201;207). De plus, il a été suggéré que le VRT-325 servirait de point d'ancrage pour les segments transmembranaires du CFTR à la membrane (204). Par contre, à haute concentration, le VRT-325 perdrait ses effets bénéfiques sur la correction du CFTR en réduisant l'affinité de l'ATP pour le site catalytique à l'interface des NBD et affectant ainsi la stabilité du canal à l'état ouvert (208). Il a été démontré que le VRT-325 ne se liait pas au même endroit que l'ATP au site catalytique. En fait, il préviendrait, à fortes doses, la liaison de l'ATP, plutôt en tant qu'inhibiteur allostérique, ce qui modifierait l'hétérodimérisation des NBD affectant ainsi l'ouverture du canal (208). Il a aussi été proposé que le VRT-325 se lierait sur les canaux CFTR- $\Delta$ F508, stabilisant ainsi un certain nombre de canaux mutés à la membrane, leur évitant ainsi d'être prématurément recyclés (200;208).

Le VRT-532, d'abord identifié comme potentiateur, serait également capable de favoriser la correction du CFTR muté via une interaction directe (200;201;207;209). Il a été proposé que le VRT-532 stabiliserait l'état ouvert du canal, en se liant soit à l'interface des NBD1-NBD2, soit sur les boucles intracellulaires ou bien encore sur le domaine R (210-212). Ce composé serait toutefois moins efficace que le Corr-4a et le VRT-325 (201).

Les composés benzo(c)quinolizinium, tels que le MPB-91 et le MPB-07, ont également des propriétés correctrices. Le MPB-91 empêcherait la dégradation protéolytique entre le NBD1 et le domaine R sur le CFTR- $\Delta$ F508 (213;214). De façon intéressante, le MPB-07 permettrait l'adressage spécifique du CFTR- $\Delta$ F508 (24;215). Ces molécules seraient capables d'augmenter l'expression membranaire du CFTR et de stimuler l'activité de ces canaux corrigés (213).

Le miglustat, un médicament déjà approuvé pour le traitement de la maladie de Gaucher, permettrait de restaurer un CFTR fonctionnel dans plusieurs types cellulaires. Son mode d'action passerait par l'inhibition de l'étape de glycosylation du CFTR par la  $\alpha$ -1,2-glucosidase (216;217). Ce phénomène, ainsi bloqué, préviendrait l'interaction entre le CFTR et la calnexine, évitant l'adressage de la protéine mutée vers la dégradation (216). De plus, ce correcteur posséderait également des propriétés anti-inflammatoires. En effet, il diminuerait

l'expression des récepteurs glycolipidiques du PAO1, la souche de laboratoire de *P. aeruginosa*, et la production d'IL-8, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  (216).

Différentes équipes se sont ensuite intéressées aux inhibiteurs de la phosphodiesterase 5, tels que le sildenafil ou le vardenafil, qui favoriseraient la maturation et l'expression du CFTR- $\Delta$ F508 à la membrane, permettant de rétablir un courant Cl<sup>-</sup> activé par l'AMPc (37;79). Il a été montré que le vardenafil serait également capable d'atténuer la réponse inflammatoire en réponse au LPS de *P. aeruginosa* (24;218). Un analogue structural du sildenafil, le KM11060, induirait la maturation du CFTR muté, soit par la phosphorylation du CFTR ou par l'altération des processus impliqués dans son repliement (79).

Le RDR1 a aussi démontré sa capacité à induire la maturation du CFTR- $\Delta$ F508 ainsi que son adressage à la membrane. Il serait également capable de restaurer le mécanisme d'ouverture semblable à un CFTR sauvage. Le RDR1 se fixerait sur le NBD1, mais pas aux mêmes sites que le VRT-532 (211;219).

La glafenine est un anti-inflammatoire non-stéroïdien utilisé dans le traitement de la douleur. Toutefois, ce composé semblerait également capable d'induire des courants Cl<sup>-</sup> CFTR dans plusieurs types cellulaires. Il augmenterait également l'expression membranaire du CFTR, sans affecter les niveaux d'ARNm (220).

Les composés C4 et C18 ont été développés plus récemment. Ils permettraient l'adressage du canal CFTR muté à la membrane (221) en favorisant le recyclage des canaux aux dépens de la voie de dégradation (222). Le C18 induirait une meilleure correction, jusqu'à 3,5 fois plus, de l'expression membranaire du CFTR que le composé C4 (221).

Un des correcteurs les plus étudiés ces dernières années a été le Vx-809. Les premières études *in vitro* ont démontré qu'il améliorerait le repliement et la maturation des canaux mutés, résultant en une augmentation de l'expression du CFTR à la membrane (223). Des essais cliniques ont ensuite permis d'observer une diminution significative de la concentration de sel dans la sueur suite à des traitements au Vx-809, sans toutefois mesurer une amélioration de la fonction pulmonaire (224). Puisque le Vx-809 avait un effet limité lorsqu'administré seul, des équipes ont ensuite testé l'efficacité de sa combinaison avec le potentiateur VX-770 (225;226). Par le passé, il a été démontré que les correcteurs du CFTR ne permettaient qu'une correction partielle du canal. De plus, il semblerait qu'un canal CFTR corrigé était plus instable à la membrane et qu'il répondait moins bien à l'AMPc (202;203;227). Ainsi, il a été

proposé que l'ajout d'un potentiateur, stimulant le peu de canaux présents à la membrane, permettrait d'obtenir des effets bénéfiques plus significatifs. Effectivement, c'est avec une combinaison des doses les plus fortes de VX-809 et de VX-770 qu'une amélioration de la fonction pulmonaire de presque 9% a pu être mesurée (225;226). Une autre étude sur une population plus large est présentement en cours pour confirmer l'efficacité de cette thérapie combinant ces 2 composés (7).

L'idée de combiner les correcteurs est venue dès le développement de ces premiers composés (204). En fait, les auteurs de ces études s'étaient vite rendu compte que ces molécules ne permettaient qu'une correction partielle du canal CFTR. À travers les années, plusieurs combinaisons ont été testées *in vitro* (51;204;221;228), mais aucune combinaison jusqu'à ce jour n'a eu des effets significativement escomptés. Récemment, Okiyoneda *et al.* ont proposé que les correcteurs doivent être classés selon leur mode d'action (229). En effet, la première classe regrouperait les molécules qui permettraient les interactions entre les domaines favorisant ainsi le repliement du canal, alors que les composés de la deuxième classe cibleraient le défaut d'assemblage du NDB2. Les correcteurs de la troisième classe viseraient à stabiliser la conformation du NBD1- $\Delta$ F508. Selon les auteurs, la combinaison des trois types de molécules, corrigeant les différents défauts structuraux du CFTR muté, constituerait une meilleure approche thérapeutique.

Plusieurs études démontrent également que l'efficacité des correcteurs varie d'un type cellulaire à un autre et d'un patient à un autre (55;230-232). En effet, certains correcteurs seraient efficaces pour augmenter la sécrétion de Cl<sup>-</sup> seulement dans des cellules en lignées et n'induraient aucun effet bénéfique dans des cellules humaines primaires des voies aériennes (231). Les causes de cette variabilité ne sont pas encore élucidées, mais certaines hypothèses ont été proposées. D'une part, il a été suggéré que les voies de biosynthèse et de dégradation du CFTR pouvaient varier entre les types cellulaires (232). Ainsi, des différences, d'une cellule à l'autre, dans les mécanismes de maturation, d'adressage ainsi que de dégradation (55) pourraient alors moduler le nombre de canaux CFTR mutés disponibles à la correction ou affecter le mode d'action des molécules correctrices, affectant ainsi donc leur efficacité.

En résumé, les thérapies adaptées à chacune des classes de mutation constituent un domaine très prometteur, puisqu'elles traitent de façon ciblée les défauts du canal CFTR. Un bon exemple serait la thérapie à base du potentiateur VX-770 (Ivacaftor ou Kalydeco)

nouvellement approuvée pour les patients G551D. Pour ce qui est des mutations de la classe II, l'utilisation de plusieurs composés intervenant aux différentes étapes de maturation, d'adressage et/ou du repliement de la protéine combinée à l'activation subséquente du canal CFTR corrigé pourrait s'avérer être la meilleure stratégie thérapeutique à ce jour. Plusieurs études et tests restent cependant à faire pour identifier les composés les plus efficaces et compatibles.

#### **1.4.8) Conclusions concernant les thérapies en fibrose kystique**

La pathologie de la FK est caractérisée par un dysfonctionnement du transport ionique, une réponse inflammatoire chronique exacerbée et des infections récurrentes. Tous ces phénomènes entraînent des lésions épithéliales et un remodelage important qui favorisent la progression de la maladie. Aucune thérapie traitant tous les aspects de la pathologie n'est disponible à ce jour. La correction du défaut de base du CFTR pourrait devenir une option intéressante, en permettant le rétablissement de la fonction du canal et en favorisant la clairance mucociliaire. Toutefois, même avec les correcteurs les plus efficaces, le dommage tissulaire chez les patients dont l'atteinte pulmonaire est déjà trop avancée demeurera et ne pourra probablement pas être renversé. C'est pourquoi la meilleure option pour l'instant reste de traiter les symptômes, de corriger le défaut de base du CFTR et d'opter pour des thérapies complémentaires afin de promouvoir la régénération épithéliale des voies aériennes, ce qui permettrait de stabiliser, voire d'améliorer l'état des patients FK.

## Chapitre 2 – Hypothèses de travail

La pathologie de la fibrose kystique (FK) est causée par les mutations du gène codant pour le canal Cl<sup>-</sup> CFTR (1;2). La mutation la plus fréquente en FK est la délétion du résidu Phe508 ( $\Delta$ F508), qui cause un mauvais repliement du canal entraînant sa dégradation (53;54). Au niveau des voies aériennes, un contrôle adéquat du transport des ions et des fluides est nécessaire au maintien du volume périciliaire et d'une clairance mucociliaire efficace, assurant le bon fonctionnement du système respiratoire. L'absence du canal CFTR entraîne un dysfonctionnement du transport de Cl<sup>-</sup> et de la clairance mucociliaire. Il en résulte une accumulation importante de mucus épais et visqueux obstruant les voies aériennes et favorisant la colonisation bactérienne et l'inflammation (17;61;65). La présence persistante d'oxydants, de protéases et de différents médiateurs inflammatoires entraînerait une destruction graduelle de l'épithélium des voies aériennes, ce qui résulte en une perte de l'intégrité épithéliale et un remodelage tissulaire (94;101;107;110). Il a été suggéré par ailleurs que la perte de l'intégrité épithéliale pouvait favoriser l'adhérence de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (83;87) et donc, la colonisation bactérienne dans les voies aériennes FK. De plus, l'infection chronique ainsi que la présence d'exoproduits bactériens pourraient altérer davantage les processus de régénération épithéliale (96-100). Ces phénomènes créeraient ainsi un cercle vicieux d'infection, d'inflammation et de dommages épithéliaux (63;65;82), qui pourrait accentuer le déclin de la fonction pulmonaire (10;88;101;105;112;116;120).

En se basant sur ces évidences, nous avons pensé que la promotion de la réparation épithéliale des voies aériennes dès les premières insultes deviendrait alors capitale pour ralentir la progression de la maladie. Jusqu'à ce jour, très peu d'équipes s'étaient consacrées à l'élaboration de stratégies visant à promouvoir la réparation des lésions épithéliales pulmonaires. En effet, la plupart des stratégies développées actuellement visent à corriger le défaut de base du CFTR et à contrôler les infections bactériennes ainsi que l'inflammation chronique.

L'équipe du D<sup>re</sup> Coraux avait démontré, à l'aide d'un modèle de xéno greffe développé pour l'étude de la réépithélisation, que les cellules FK présentaient un retard de régénération et des anomalies histologiques comparativement à des cellules non-FK. De plus, ce défaut de régénération épithéliale semblait être associé à une dérégulation de l'activité des MMP et une augmentation de la production d'IL-8 (116). De notre côté, les travaux que j'ai réalisés au



cours de ma maîtrise (*Trinh et al. AJP 2008*) démontraient, en comparaison avec des cellules bronchiques saines (NuLi-1), que les cellules bronchiques humaines FK (CuFi-1) exhibaient également un retard de réparation (149). Le but de mes travaux de doctorat a été d'étudier la réparation épithéliale en FK afin d'abord de mieux comprendre les mécanismes responsables du délai de réparation en FK et ensuite, de proposer de nouvelles avenues thérapeutiques.

Mes hypothèses de recherche étaient :

- 1) Les observations du D<sup>re</sup> Coraux ainsi que celles de notre équipe suggèreraient que les cellules FK montraient un délai de réparation et ce, même en absence d'infection et d'inflammation (116;149). De plus, une étude par Schiller *et al.* indiquait que l'inhibition de CFTR limitait le processus de migration des cellules Calu-3. Ceci nous a amené à poser l'hypothèse que l'épithélium FK pouvait présenter un défaut de réparation de base et celui-ci pouvait être directement associé à l'absence de canal CFTR fonctionnel.
- 2) Il a été démontré que les correcteurs de CFTR facilitent la maturation et l'adressage du CFTR muté à la membrane (37;52;79;200). De plus, il a été suggéré qu'une correction du CFTR de seulement 5 à 10% pourrait être suffisante pour améliorer les paramètres cliniques des patients FK (79;200;201). Si le défaut de réparation de base de l'épithélium FK était réellement dû au dysfonctionnement de CFTR, nous avons alors émis l'hypothèse que la correction de celui-ci pourrait améliorer la réparation épithéliale.
- 3) Enfin, il a été établi que l'infection bactérienne chronique est une composante majeure de la pathogenèse de la FK. En effet, plusieurs études rapportent que les bactéries sécrètent des exoproduits qui affecteraient les processus de réparation/régénération épithéliale (95-97;99;100;111;233-235). C'est pourquoi nous avons voulu mieux comprendre l'impact de l'infection sur la fonction du CFTR dans les cellules non-FK et sur l'efficacité des correcteurs dans les cellules FK.

Pour tester mes hypothèses de travail, nous avons utilisé différents modèles de cellules en lignée, tels que les cellules bronchiques humaines FK CuFi-1 (homozygotes  $\Delta F508$ ) et non-

FK NuLi-1, les cellules bronchiques FK IB3 ( $\Delta F508/W1282X$ ) et non-FK S9 (cellules IB3 transduites avec du CFTR-wt) ainsi que les cellules bronchiques FK CFBE41o- surexprimant du CFTR- $\Delta F508$  (CFBE- $\Delta F508$ ) ou du CFTR-wt (CFBE-wt). Lors de notre étude sur le défaut de réparation épithéliale en FK, nous avons choisi les lignées cellulaires NuLi-1 et CuFi-1, qui expriment des niveaux de base de CFTR, pour pouvoir comparer les vitesses de réparation et de migration entre des cellules non-FK et FK. Toutefois, ces cellules sont issues de deux patients différents, ce qui aurait pu influencer les résultats observés. Pour pouvoir confirmer nos résultats impliquant le CFTR dans les processus de réparation, nous avons ensuite décidé d'étudier les paires de cellules IB3 et S9 ainsi que CFBE- $\Delta F508$  et CFBE-wt. Ainsi, l'utilisation des cellules S9 et des cellules CFBE-wt, qui ont le même fond génétique que les cellules FK correspondantes, nous ont servies à démontrer que la transduction d'un CFTR-wt dans des cellules bronchiques FK permettait d'améliorer la capacité des monocouches cellulaires à se réparer.

Afin de valider notre concept dans les lignées cellulaires, nous avons voulu confirmer nos résultats dans des cellules humaines primaires des voies aériennes. L'intérêt d'utiliser ces cellules humaines primaires vient du fait qu'elles n'ont pas été transformées contrairement aux cellules en lignée. Les résultats obtenus sur les cellules humaines primaires ont donc l'avantage d'être plus pertinent pour le domaine de recherche pour les patients FK. Nous avons donc utilisé des cellules humaines primaires des voies aériennes, que nous avons isolées à partir de bronches et de polypes nasaux provenant de patients non-FK et FK.

Durant mes travaux, nous avons utilisé différentes approches expérimentales pour étudier les différents paramètres de la réparation épithéliale. La capacité de réparation des monocouches cellulaires a été évaluée par un modèle de plaie mécanique. Il est bien établi que les processus de réparation épithéliale dépendent entre autres des phénomènes de migration et de prolifération cellulaire. Ainsi, pour évaluer le rôle de CFTR durant la migration cellulaire, nous avons mesuré par vidéo-microscopie les trajectoires de cellules sous-confluentes, mais également celles de cellules dans une monocouche en réparation. Par la suite, pour mieux comprendre l'implication du CFTR dans le processus prolifératif, nous avons quantifié le marquage de la protéine Ki-67 en immunofluorescence dans des cellules en bord de plaies. Ensuite, nous avons voulu évaluer l'impact du filtrat du *P. aeruginosa* sur l'expression et la

fonction de CFTR. Pour se faire, nous avons mesuré l'expression génique et protéique de CFTR par PCR en temps réel ainsi que par immunobuvardage de type Western, alors que la fonction de CFTR a été évaluée par des mesures de courants court-circuits en chambre de Ussing.

### **Chapitre 3 – Résultats publiés et contribution aux articles**

Les processus de réparation en FK constituent le principal thème abordé dans les travaux que j'ai réalisés durant mon doctorat. Les résultats présentés dans cette thèse révèlent pour la première fois que l'épithélium FK présente un défaut de réparation de base et que celui-ci pourrait être dû, du moins en partie, au dysfonctionnement du canal CFTR. Ensuite, nous avons également montré que les correcteurs du CFTR pouvaient non seulement aider la maturation et l'adressage de la protéine mutée, mais pouvaient également améliorer la réparation épithéliale. Enfin, nous avons démontré que l'infection, une composante importante de la pathologie de la FK, pouvait affecter les fonctions de CFTR et pouvait prévenir les effets bénéfiques des correcteurs. Ainsi, ces articles mettent en perspective des points importants à prendre en considération lors du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques en FK.

#### **3.1) Résultats publiés et contribution aux articles**

##### **Article #1- Résultats publiés et contribution aux travaux**

Trinh NT, Bardou O, Prive A, Maillé E, Adam D, Lingée S, Ferraro P, Desrosiers MY, Coraux C, Brochiero E. *Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue*. Eur Respir J 2012; **40**: 1390-1400

##### **Résumé :**

Les lésions épithéliales et le remodelage tissulaire observés au niveau des voies aériennes FK seraient des composantes majeures dans la progression de la pathologie. Pour confirmer la présence et l'étendue des lésions au niveau des voies aériennes FK, nous avons d'abord effectué des analyses ultrastructurales sur des coupes de poumons provenant de patients FK collectés au moment de la transplantation. En accord avec les données de la littérature, nous avons observé des altérations morphologiques et ultrastructurales incluant de l'hyperplasie des cellules basales et caliciformes, de l'hyperplasie glandulaire et de la métaplasie squameuse. Cependant, nous avons noté une hétérogénéité de l'atteinte épithéliale en fonction des patients et des zones. En effet, nous avons observé des sections complètement dénudées exposant la membrane basale, alors que certaines zones demeuraient intactes semblables à un épithélium non-FK. Nous avons également discerné des régions présentant les signes d'une initiation de réparation épithéliale, qui demeure toutefois visiblement insuffisante

pour rétablir l'intégrité de l'épithélium des voies aériennes FK. Le but de notre étude a donc été de mieux comprendre, dans un premier temps, cette incapacité de l'épithélium FK à se réparer et, dans un deuxième temps, de définir comment le CFTR contribuerait à ce défaut de réparation. Nous avons d'abord comparé, à l'aide d'un modèle de plaies mécaniques, la réparation de monocouches de cellules FK et non-FK en lignée ainsi que de cellules épithéliales primaires humaines nasales et bronchiques issues de patients sains et FK. Ces résultats révèlent que toutes les lignées FK ainsi que tous les spécimens FK montraient un retard de réparation comparativement aux lignées/spécimens sains correspondants. Afin de montrer le rôle du CFTR dans les processus de réparation, nous avons tout d'abord testé l'impact de l'inhibition pharmacologique et moléculaire (à l'aide de siRNA) du CFTR dans des cellules non-FK. Nos résultats ont démontré que l'extinction et l'inhibition du CFTR diminuaient les phénomènes de migration et de prolifération cellulaire ainsi que la capacité de réparation des cellules. Nous avons ensuite testé l'hypothèse d'un effet bénéfique de la correction du CFTR sur les processus de réparation de l'épithélium FK. Ainsi, nous avons observé que la réparation des monocouches de cellules FK transduites avec du CFTR sauvage était améliorée. Enfin, nous avons montré, pour la première fois, que la correction du CFTR avec le correcteur VRT-325 permettait, de façon intéressante, l'amélioration de la réparation de monocouches de cellules primaires humaines bronchiques FK.

### **Ma contribution :**

C'est sous la supervision de ma directrice de recherche, D<sup>re</sup> Emmanuelle Brochiero, que j'ai participé au design expérimental et réalisé la majeure partie des expériences présentées dans cet article. J'ai également effectué les analyses et l'interprétation des données et participé à la rédaction du manuscrit. Toutefois, les coupes et analyses histologiques ont été effectuées par l'équipe du D<sup>re</sup> Christelle Coraux de l'Université de Reims en France.

### **Article #2 – Manuscrit en préparation pour soumission et contribution aux travaux**

Trinh NT, Bilodeau C, Maillé E, Quintal MC, Desrosiers MY, Lukacs G, Rousseau S, Brochiero E. *Deleterious impact of Pseudomonas aeruginosa on CFTR expression and function in airway epithelial cells.*

**Résumé :**

L'infection bactérienne, spécialement par la bactérie *P. aeruginosa*, est un paramètre important de la pathogenèse de la FK. Toutefois, l'effet de l'infection sur la fonction du CFTR n'a pas été totalement élucidé et son impact sur l'efficacité des correcteurs du CFTR n'a jamais été étudié à ce jour. Le but de notre étude a donc été d'évaluer les effets des exoproduits contenus dans le filtrat bactérien de *P. aeruginosa* (PsaDM, *P. aeruginosa* diffusible material) sur l'expression et la fonction du CFTR dans les cellules non-FK et sa correction dans les cellules FK. Nous avons d'abord montré que la fonction de CFTR dans des cellules épithéliales bronchiques saines (CFBE-wt) était grandement altérée en présence de PsaDM. Nous avons aussi observé que l'expression protéique, et non l'expression génique, de CFTR était fortement diminuée après un traitement avec le filtrat bactérien dans les cellules saines et FK. En effet, nous avons noté une diminution du niveau d'expression des formes matures et immatures (correspondant aux bandes C et B, respectivement, en immunobuvardage de type Western) dans les cellules saines CFBE-wt ainsi qu'une diminution de la forme immature (bande B) présente dans les cellules FK CFBE-ΔF508. Nos résultats suggèrent aussi que les exoproduits de *P. aeruginosa* diminueraient la biosynthèse des canaux CFTR de type sauvage (CFTR-wt) tout en induisant une augmentation de leur dégradation. De plus, nous avons démontré que le filtrat bactérien de *P. aeruginosa* affectait de façon importante la maturation du CFTR dans les cellules FK induite par le correcteur VRT-325. Nous avons également mesuré, dans les CFBE-ΔF508 traitées avec du VRT-325, des courants Cl<sup>-</sup> activés par l'AMPC plus faibles suite à un traitement avec du PsaDM. Enfin, nous avons confirmé l'effet délétère des exoproduits de *P. aeruginosa* sur les courants CFTR-wt et sur les courants CFTR-ΔF508 corrigés avec le VRT-325 à partir de cultures différenciées de cellules primaires humaines des voies aériennes issues de patients sains et FK.

**Ma contribution :**

J'ai participé au design expérimental et j'ai réalisé la plupart des expériences, leurs analyses et interprétations sous la supervision du D<sup>re</sup> Emmanuelle Brochiero. Les expériences de biosynthèse et de dégradation du CFTR ont été réalisées à l'aide des judicieux conseils du D<sup>r</sup> Simon Rousseau des laboratoires Meakins-Christie de l'Université de McGill.



# Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue

Nguyen Thu Ngan Trinh<sup>\*,#</sup>, Olivier Bardou<sup>\*,#</sup>, Anik Privé<sup>\*</sup>, Emilie Maillé<sup>\*</sup>, Damien Adam<sup>†</sup>, Sarah Lingée<sup>†</sup>, Pasquale Ferraro<sup>\*,†</sup>, Martin-Yvon Desrosiers<sup>\*</sup>, Christelle Coraux<sup>†</sup> and Emmanuelle Brochiero<sup>\*,#</sup>

**ABSTRACT:** Airway damage and remodelling are important components of lung pathology progression in cystic fibrosis (CF). Although repair mechanisms are engaged to restore the epithelial integrity, these processes are obviously insufficient to maintain lung function in CF airways. Our aims were therefore to study how the basic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) defect could impact epithelial wound healing and to determine if CFTR correction could improve it.

Wound-healing experiments, as well as cell migration and proliferation assays, were performed to study the early phases of epithelial repair in human CF and non-CF airway cells. CFTR function was evaluated using CFTR small interfering (si)RNA and inhibitor GlyH101 in non-CF cells, and conversely after CFTR rescue with the CFTR corrector VRT-325 in CF cells.

Wound-healing experiments first showed that airway cells from CF patients repaired slower than non-CF cells. CFTR inhibition or silencing in non-CF primary airway cells significantly inhibited wound closure. GlyH101 also decreased cell migration and proliferation. Interestingly, wild-type CFTR transduction in CF airway cell lines or CFTR correction with VRT-325 in CFBE-ΔF508 and primary CF bronchial monolayers significantly improved wound healing.

Altogether our results demonstrated that functional CFTR plays a critical role in wound repair, and CFTR correction may represent a novel strategy to promote the airway repair processes in CF.

**KEYWORDS:** Bronchial, CFTR channel, CFTR corrector, damage, nasal, wound healing

In cystic fibrosis (CF), mutations of the gene coding for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channels cause dysfunction of chloride (Cl<sup>-</sup>) secretion, resulting in unbalanced ion and fluid transport that reduces mucociliary clearance in the airways and favours bacterial colonisation and chronic inflammation [1]. The presence of bacterial virulence factors, proteases and inflammatory mediators are then responsible for airway damage and remodelling [2, 3]. Severe bronchiectasis is the most commonly observed structural abnormality in CF airways. Ultrastructural modifications, including epithelial shedding [4–7], also occur, but their extent and severity are not well defined. The outcomes for the loss of epithelial integrity may be multiple. For example, epithelial shedding could play a role in bacterial colonisation by favouring *Pseudomonas*

*aeruginosa* adherence [8–11], thus contributing to the progression of CF lung disease.

After injury, epithelial tissues initiate several repair processes, including cell spreading, migration, proliferation and re-differentiation, in an attempt to restore the normal architecture [12]. These processes are controlled by several growth factors, including epidermal growth factor (EGF), through EGF receptors (EGFR), which is a convergent pathway that produces motility and proliferative responses [3, 13–17]. We recently demonstrated that an autocrine EGF/EGFR loop and K<sup>+</sup> channel function are critical for epithelial repair [17]. Despite the establishment of epithelial repair mechanisms and the presence of high levels of growth factors in CF-patients' airways [3], airway epithelia are gradually damaged and

## AFFILIATIONS

\*Centre de recherche Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM),  
#Département de médecine, Université de Montréal,  
\*Département de chirurgie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.  
†INSERM UMRS 903, Université Champagne Ardenne, Reims, France.

## CORRESPONDENCE

E. Brochiero  
CRCHUM  
Hôtel-Dieu  
3840  
St-Urbain  
Montréal  
Québec  
Canada H2W 1T8  
E-mail: [REDACTED]

## Received:

Dec 16 2011

Accepted after revision:

March 06 2012

First published online:

April 10 2012

European Respiratory Journal

Print ISSN 0903-1936

Online ISSN 1399-3003

This article has supplementary material available from [www.erj.ersjournals.com](http://www.erj.ersjournals.com)

remodelled in CF patients. However, it is not yet clear whether the inability of CF airways to regenerate themselves is due to a basic repair defect of CF airway epithelia and/or to deleterious infectious and inflammatory mediators. Several lines of evidence indicate that the basic CFTR defect could impair epithelial repair and regeneration, even in the absence of infection. In fact, abnormal and delayed regeneration of CF airway epithelia were first observed in a nude mice xenograft model [18]. Subsequently, our *in vitro* data indicated that wound healing and cell migration in CF (CuFi-1) bronchial cell monolayers were slower than in non-CF (NuLi-1) cell monolayers [17]. In addition, it was shown that CFTR inhibition or knockdown in human airway epithelial cell line Calu-3 cells slowed down wound repair [19].

The first goal of our study was to test the hypothesis that the early processes engaged in airway epithelial repair are delayed in the primary monolayers from CF patients. To prove the involvement of CFTR channels, we evaluated the effect of CFTR downregulation on epithelial wound healing, as well as on cell migration and proliferation. Finally, we tested for the first time the ability of the CFTR corrector VRT-325 to improve CF airway epithelial wound healing.

## MATERIALS AND METHODS

### Histological analysis of bronchial sections

CF lung tissues were sourced from ten  $\Delta F508/\Delta F508$  CF transplanted patients (median age 21 yrs at time of lung transplantation), chronically infected by *P. aeruginosa*, either alone or associated with *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Burkholderia cepacia* or *Aspergillus*. Non-CF control bronchial tissues were obtained from donor organs not employed for transplantations. Tissue samples were fixed in Shandon Cryomatrix frozen embedding medium (Thermo Fisher Scientific, Kalamazoo, MI, USA) and snap frozen in liquid nitrogen before cutting into serial 5- $\mu\text{m}$  sections and staining with the Shandon Rapid chrome H&E frozen section staining kit (Shandon, Thermo Fisher Scientific).

### Cell culture

Several non-CF and CF cell lines have been used: NuLi-1 and CuFi-1 (homozygous  $\Delta F508/\Delta F508$ ), both generously provided by J. Zabner (University of Iowa, Iowa City, IA, USA) [20], IB3 ( $\Delta F508/W1282X$ , ATCC) and S9 (wild type (wt)-CFTR genetically repaired CF IB3 cells, ATCC); CFBE41o<sup>-</sup> transduced with wt-CFTR (CFBE-wt) or  $\Delta F508$ -CFTR (CFBE- $\Delta F508$ ) [21], kindly provided by J. Hanrahan (McGill University, Montreal, Quebec, Canada). Cell culture conditions are detailed in the online supplementary material.

Primary human bronchial cells were isolated from CF homozygous  $\Delta F508/\Delta F508$  lung transplants (median age 31 yrs, mean forced expiratory volume in 1 s (FEV<sub>1</sub>)  $23.6 \pm 2.1\%$ ) and non-CF donors, while primary human nasal cells were recovered after polypectomy procedures from non-CF and CF patients (with various genotypes, *i.e.* two homozygous  $\Delta F508/\Delta F508$ , one  $\Delta F508/A555E$  and one  $C621+1G \rightarrow T/P-L206W$ , median age 16 yrs, mean FEV<sub>1</sub> of  $81.6 \pm 14.2\%$ ), according to ethically approved protocols. Cell isolation and culture conditions are provided in the online supplementary material.

### Wound-healing assay

Airway epithelial cells were injured mechanically with a P10 pipette tip (six wounds per Petri dish) according to a highly reproducible technique [16, 17, 22]. This commonly employed "wound-healing assay" allows study of early mechanisms engaged after injury, *i.e.* cell migration and proliferation. A mark on the Petri dishes allowed us to photograph the wounds at exactly the same place at various times (at time 0 after injury and after 6 h and/or 24 h of wound closure). The rate of wound closure, presented in  $\mu\text{m}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ , was calculated with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) from the wound area measured after repair compared with the initial wound area.

### Time-lapse experiments

NuLi-1 and CuFi-1 cell migratory rates ( $\mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ ) were evaluated by single-cell tracking at the wound edge in videomicroscopy experiments, over a 60-min period of repair ( $\times 10$  enlargement). In primary nasal cells, time-lapse experiments were performed over a 6-h period on subconfluent monolayers ( $\times 20$  enlargement). The migration rate and cell trajectories were analysed by AxioVision software (Carl Zeiss, Jena, Germany).

### Cell proliferation assays

Cell growth during wound-healing assays was evaluated by counting NuLi-1 and CuFi-1 cell numbers after separation using trypsin-EDTA in confluent monolayers before injury, at time 0 after injury and after 24 h of wound healing [22]. Cell viability was verified by trypan-blue exclusion assay. Cell proliferation was also estimated by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation ( $0.5 \mu\text{Ci} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; MP Biochemical, Irvine, CA, USA) over 6-h and 18-h periods in subconfluent NuLi-1 and CuFi-1 cultures, as previously described [17].

Proliferation of primary nasal cells during wound healing was assessed by Ki-67 staining. Briefly, confluent nasal cell monolayers, cultured on Labtek chamber slides (Thermo Fischer Scientific, Rochester, NY, USA), were fixed in methanol at time 0 after injury and after 6 h and 18 h of repair, before staining with anti-Ki67 antibody (Dako Denmark, Glostrup, Sweden), then with Alexa fluor 488 goat anti-mouse secondary antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and finally counterstaining with 4',6-diamidino-6-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich Company Ltd, Gillingham, UK). The results are presented as a percentage of Ki-67 positive proliferating cells compared with total cells.

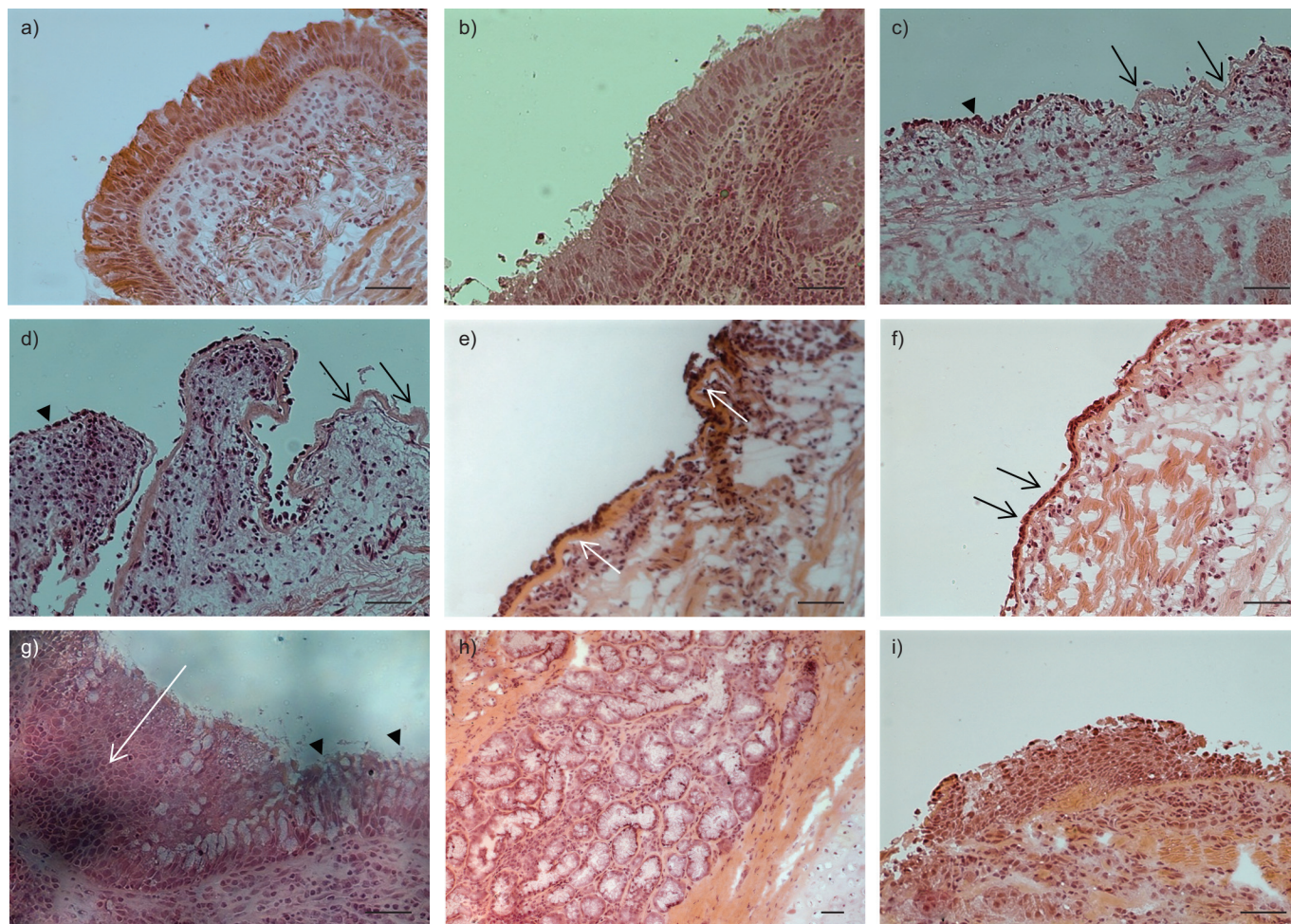
### Small interfering (si)RNA transfections

Cell suspensions of non-CF primary human nasal epithelial cells were transfected for 72 h with a combination of Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX (Invitrogen) and Universal negative control or CFTR siRNA (Sigma-Aldrich) and plated on Petri dishes coated with Purecol (Advanced Biomatrix, San Diego, CA, USA).

### Statistics

The data are presented as mean  $\pm$  SE with the number of repeated experiments and number of specimens indicated in the figure legends. Groups were compared by paired or unpaired *t*-test (as indicated) with Statview software (SAS Institute, Cary, NC, USA). Probability of  $p < 0.05$  was considered to be significant.





**FIGURE 1.** Airway epithelial alteration and remodelling in cystic fibrosis (CF) patients. Microscopic histological observation of haematoxylin and eosin stained non-CF (a) and CF (c–i) lobar and segmental bronchial sections. b) shows an intact pseudostratified area with basal, ciliated and goblet cells in CF bronchial epithelium that is similar to that observed in the non-CF airway epithelium (a). c) Lobar and d) segmental sections, respectively, show epithelial desquamation (arrows) with complete basement membrane denudation and areas where some basal cells are still attached to the basement membrane (arrowheads). e) White arrows show basement membrane thickening. f) Apparent epithelial repair with typically flattened cells covering the basement membrane (arrows) is observed. g) Basal and goblet cell hyperplasia is generally evident (indicated by white arrow and black arrowheads, respectively), as are gland hyperplasia (h) and squamous metaplasia (i). Magnifications are  $\times 10$  (a–g, i) and  $\times 20$  (h). a–i) Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

## RESULTS

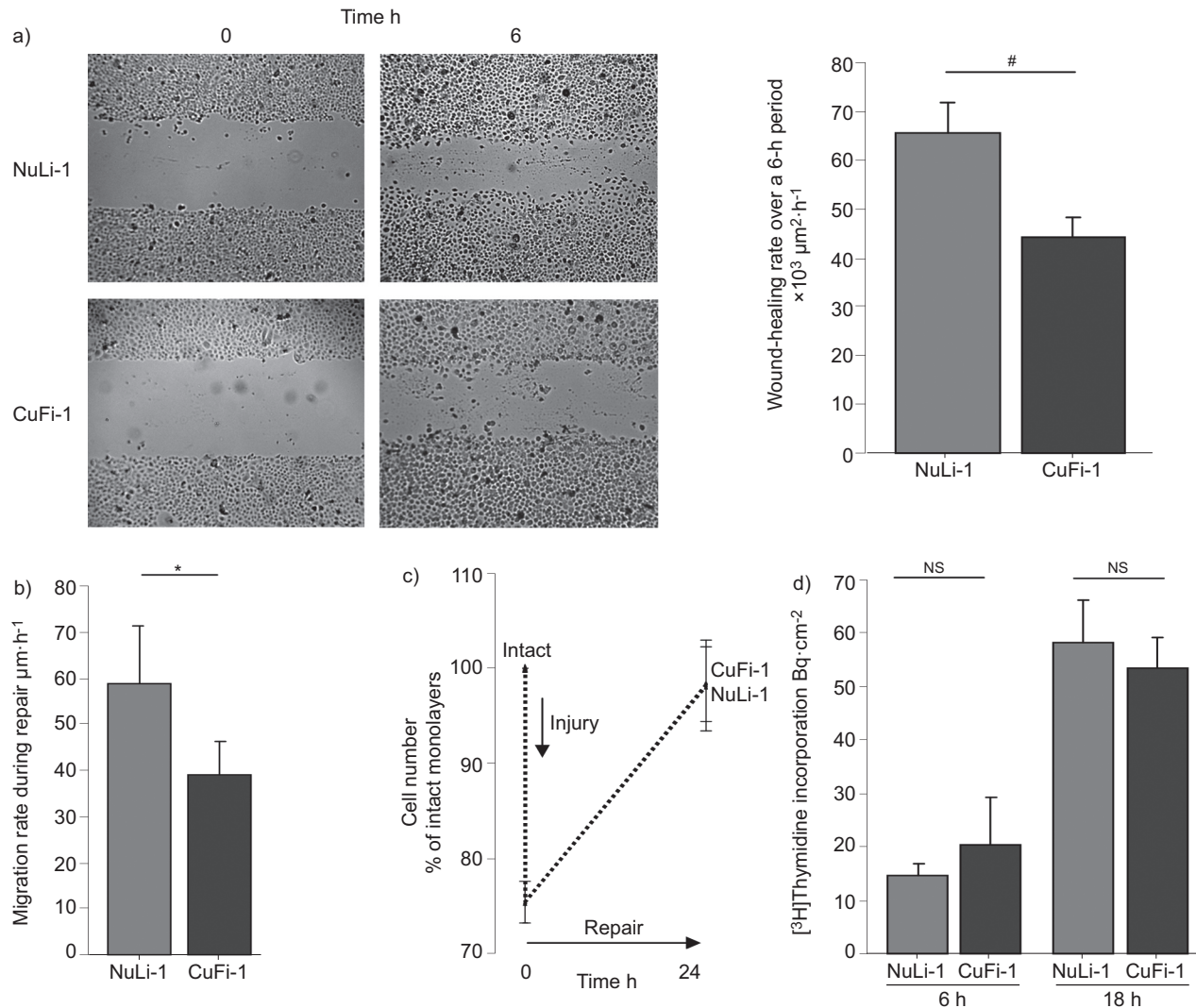
### *Histological modifications of the CF airway epithelia*

Histological alterations and remodelling of CF airways were analysed in bronchial sections of lung tissues collected from CF patients. In seven out of 10 patients, we detected focal areas with normal architecture of the pseudo-stratified epithelium (fig. 1b), similar to non-CF samples (fig. 1a). However, all 10 patients presented large areas of epithelial shedding at the lobar (fig. 1c) and segmental (fig. 1d) bronchial levels. In two out of 10 CF patients, partially repaired epithelial areas, with flattened epithelial cells covering the basement membrane, were observed (fig. 1f). In addition to epithelial injury, extended epithelial remodelling was noted with basement membrane thickening (fig. 1e), basal (five out of 10 patients) and secretory (seven out of 10 patients) cell hyperplasia (fig. 1g), gland hyperplasia and hypertrophy (10 out of 10

patients; fig. 1h) as well as squamous metaplasia (seven out of 10 patients; fig. 1i).

### *Defective repair in human CF cell lines and primary cells*

A well-established wound-healing assay with mechanical injury [16, 17, 22–24] was used to study the early processes of airway repair, especially cell migration and proliferation (fig. 2). We first observed that the wound-closure rate in non-CF NuLi-1 cell monolayers was significantly higher than in CuFi-1 cell monolayers (fig. 2a). To further investigate the delay in CF wound repair, we also evaluated their migratory and proliferative capacity after injury. The cell migration, assessed by tracking single, randomly selected cells at the wound edge in videomicroscopy experiments, showed that the mean migration rate of NuLi-1 cells was faster than that of CuFi-1 cells (fig. 2b). Cell growth was then compared in NuLi-1 and CuFi-1 repairing monolayers. After wounding, the



**FIGURE 2.** Delayed wound closure and cell migration in cystic fibrosis (CF) bronchial cell line (CuFi-1). a) Bronchial NuLi-1 and CuFi-1 cells were mechanically injured and wound healing was followed over a 6-h period ( $n=23$ ; #,  $p<0.0001$ ). Wound-closure rates and representative photographs at 0 h and 6 h are presented. b) Cell migration rates during repair of NuLi-1 and CuFi-1 cells (30 cells at the wound edge per experiment,  $n=7$ ; \*,  $p<0.05$ ) were calculated from live time-lapse videomicroscopy experiments over a 1-h period after injury to focus on cell migration and to avoid any significant cell proliferation. c) Cell growth during repair was estimated from the number of NuLi-1 and CuFi-1 cells counted before injury (intact), at time 0 after wounding, and finally after 24 h of repair ( $n=8$ ; nonsignificant (NS)). d) Cell proliferation of subconfluent NuLi-1 and CuFi-1 cell monolayers were estimated by  $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation ( $\text{Bq}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) over shorter periods of time (6 h and 18 h,  $n=9$ ; NS).

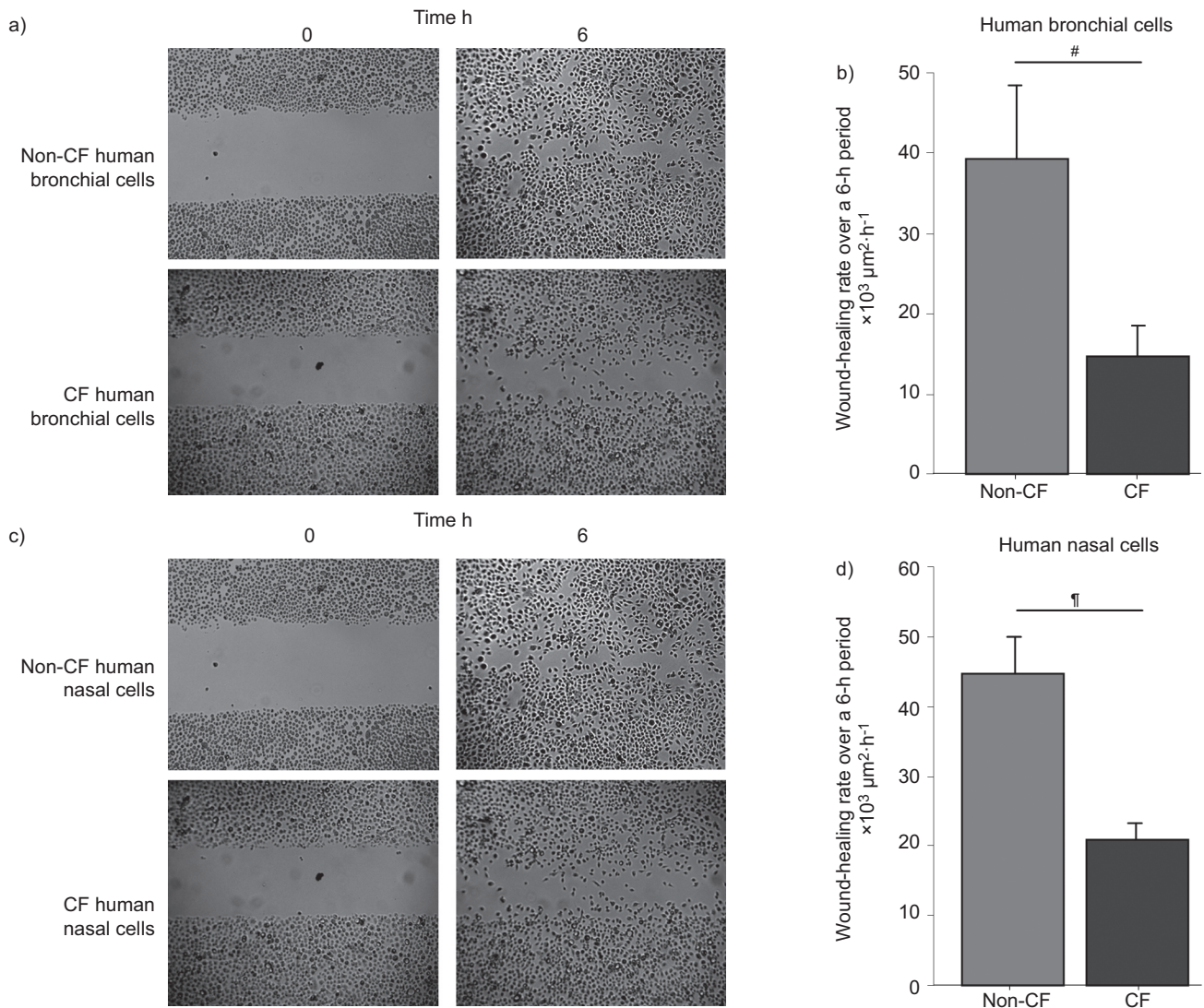
mean total number of cells was reduced by 25% compared with the intact monolayer. After 24 h, the NuLi-1 and CuFi-1 cell counts returned to the initial level measured before injury, indicating an active cell growth during wound healing in both cell lines (fig. 2c). Similarly,  $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation over shorter time periods (6 h and 18 h), in subconfluent, intact cultures indicated similar cell proliferation in both cell types (fig. 2d). Therefore, the delay in CuFi-1 wound closure most likely seems to be due to a difference in migratory rather than proliferative capacity.

Because the delay in CuFi-1 wound healing could be attributed to a genotypic difference between NuLi-1 and CuFi-1 cells, we decided to compare primary airway epithelial cells isolated from non-CF and CF patients. The wound-closure rate of CF human bronchial cell monolayers was 63% slower than that of

non-CF bronchial monolayers (fig. 3a and b). However, because these CF specimens were collected from transplants with late-stage lung disease (mean FEV<sub>1</sub> of 23%), we decided to examine a possible wound-healing delay in nasal primary airway cells from younger CF patients with better clinical conditions (mean FEV<sub>1</sub> of 82%). We found that the wound closure in CF human nasal monolayers was delayed when compared with non-CF (53% slower wound-healing rate, fig. 3c and d). Taken together, our results demonstrated that CF airway epithelia exhibit a defect in wound repair after injury.

#### Role of CFTR channels in wound healing

To determine if the absence of functional CFTR could affect the wound-healing capacity and could be responsible for the defective repair, human non-CF primary nasal cells were



**FIGURE 3.** Delayed wound closure in human cystic fibrosis (CF) primary airway cell monolayers. a, b) Monolayers of primary human bronchial cells, from non-CF donors (n=7) and CF recipient patients ( $\Delta F508/\Delta F508$ , n=8; #: p<0.03) isolated after lung transplantation and c, d) primary human nasal cells from non-CF and CF patients (n=4; †: p<0.006) were wounded. Their wound-healing rates were compared after 6 h (b, d). Representative photographs at 0 h and 6 h after injury are presented in a) and c).

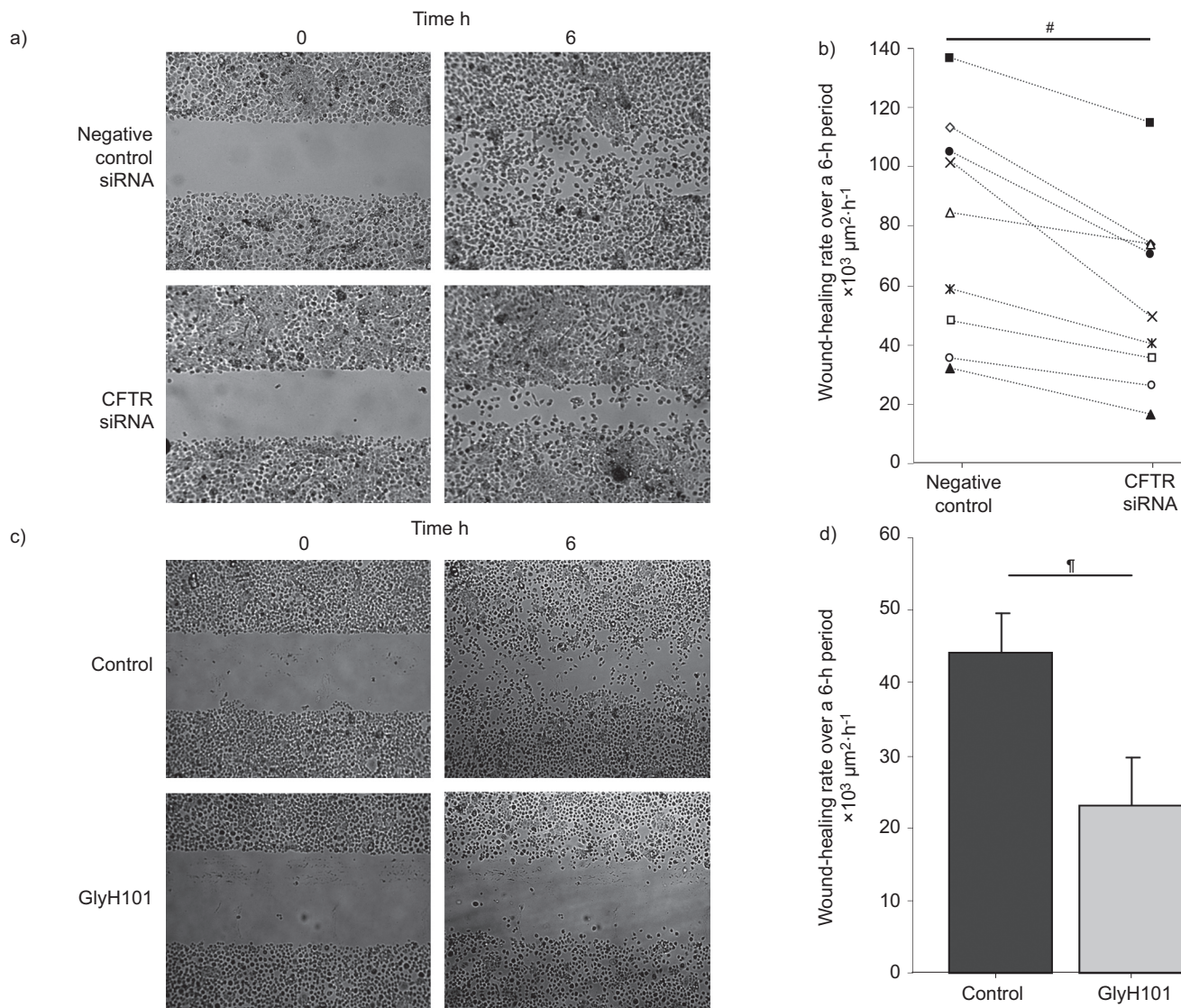
transfected with either universal negative control or CFTR siRNA. The efficiency of CFTR siRNA to downregulate CFTR mRNA and protein expression was verified first (fig. S1). We found that partial CFTR silencing elicited a significant decrease in wound healing (fig. 4a and b) in all nine tested patients (mean closure rates of  $79,528 \pm 12,463$  and  $55,649 \pm 10,176 \mu\text{m}^2\cdot\text{h}^{-1}$  in control and CFTR siRNA conditions, respectively; p<0.002). To determine if the Cl<sup>-</sup> conductance through CFTR channels is involved in this phenomenon, the impact of the CFTR inhibitor GlyH101 was tested. As depicted in fig. 4c and d, GlyH101 reduced the wound-healing rates of the nasal cell monolayers by 47%.

The role of CFTR in cell migration dynamics was assessed by single-cell tracking of subconfluent non-CF nasal cells in videomicroscopy. As observed in fig. 5a, CFTR inhibition reduced cell migration rates and affected cell trajectories. The effect of CFTR inhibition on cell proliferation, estimated by Ki-67 staining of nasal cells during wound healing, was also

determined. CFTR inhibition elicited a slight, nonsignificant decrease in Ki-67 positive cells at 6 h; however, it reduced by one-third (p<0.03) the number of proliferating cells at 18 h of wound healing as reported in figures 5c and d. Altogether, these results indicate that functional CFTR channels are crucial for airway wound healing, as well as cell migration and proliferation processes.

**Impact of CFTR correction on airway wound healing**

Since the observed delay in CF wound healing may be due, at least in part, to CFTR dysfunction, a possible beneficial impact of CFTR correction was evaluated. The wound-healing rates of the CF cell line IB3 and the wt-CFTR corrected IB3 (S9) cell line were compared: S9 cell monolayers exhibited a 30% increase in the wound-healing rate compared with IB3 (fig. 6a) Similarly, we noted ~1.3-fold improvement in the wound-healing capacity of CFBE41o<sup>-</sup> cells over-expressing wt-CFTR relative to cells expressing  $\Delta F508$ -CFTR (fig. 6b).



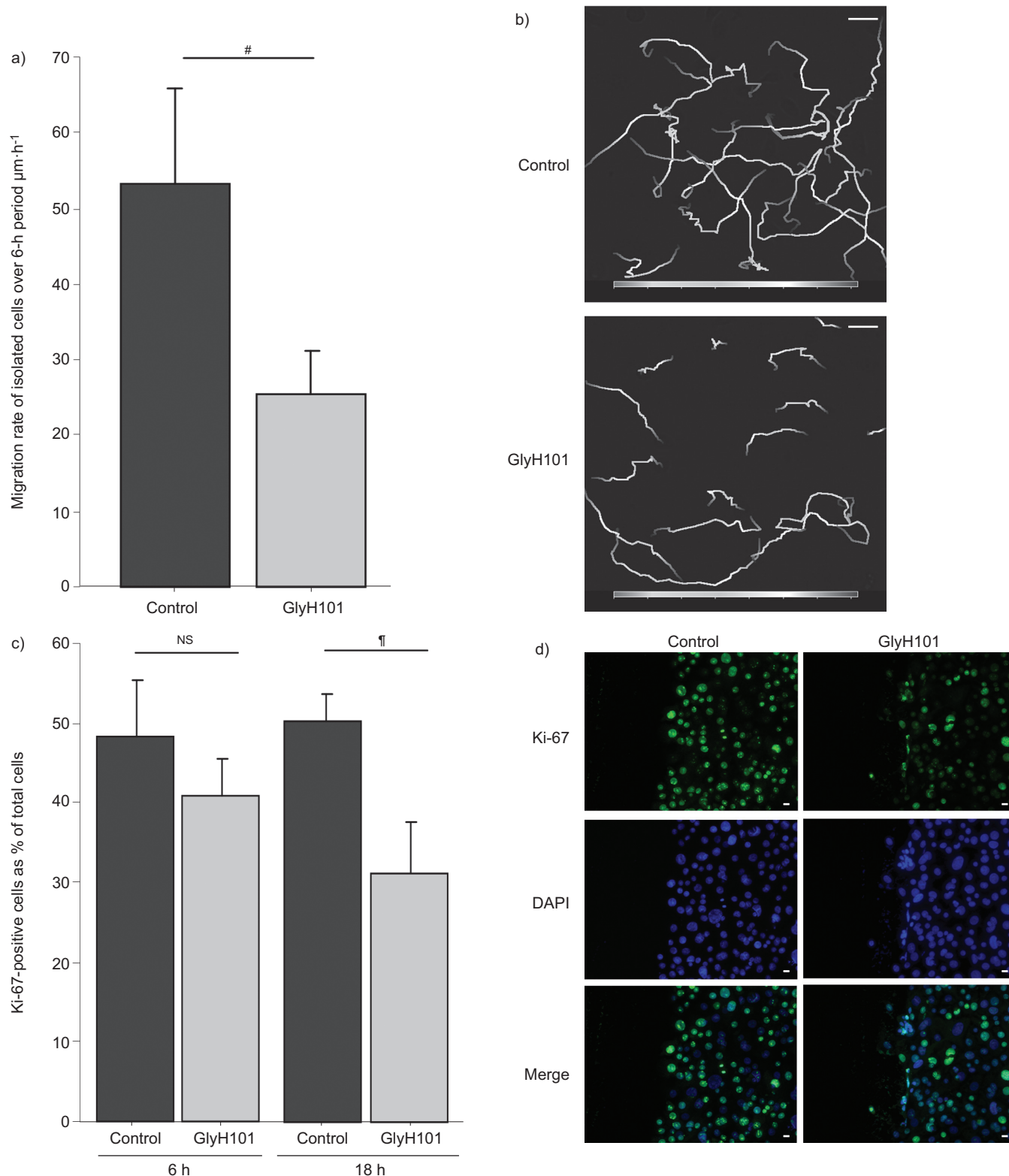
**FIGURE 4.** Decreased wound healing after cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) silencing and inhibition in primary airway cell monolayers. a, b) Primary airway nasal non-cystic fibrosis (CF) cells were transfected with universal negative control siRNA (100 nM) or CFTR siRNA (100 nM). Wound-healing rates were measured at 6 h after injury in both conditions (negative control or CFTR siRNA; #:  $p < 0.02$ ) for nine different patients (each symbol represents a different patient). c, d) Wound-healing rate of primary non-CF nasal cell monolayers was measured at 6 h after injury in the presence or absence (control) of the CFTR inhibitor GlyH101 (20  $\mu\text{M}$ , 1-h pre-treatment,  $n = 6$ ; \*:  $p < 0.03$ ). Representative photographs at 0 h and 6 h are presented in a) and c).

New pharmacological tools, including the corrector VRT-325 have been shown to rescue misprocessed CFTR, particularly  $\Delta\text{F508}$ -CFTR [25–28]. We first verified that VRT-325 was able to partially rescue CFTR protein and to recover channel activity in CFBE- $\Delta\text{F508}$  cells (fig. S3). VRT-325 also significantly enhanced the wound-repair rates of CFBE- $\Delta\text{F508}$  cell monolayers (fig. 7a) reaching a level closer to that of CFBE-wt. Interestingly, CFTR rescue with VRT-325 also improved the wound-healing rates in primary bronchial cell monolayers from all four tested CF lung transplants (mean 1.8-fold increase; fig. 7b).

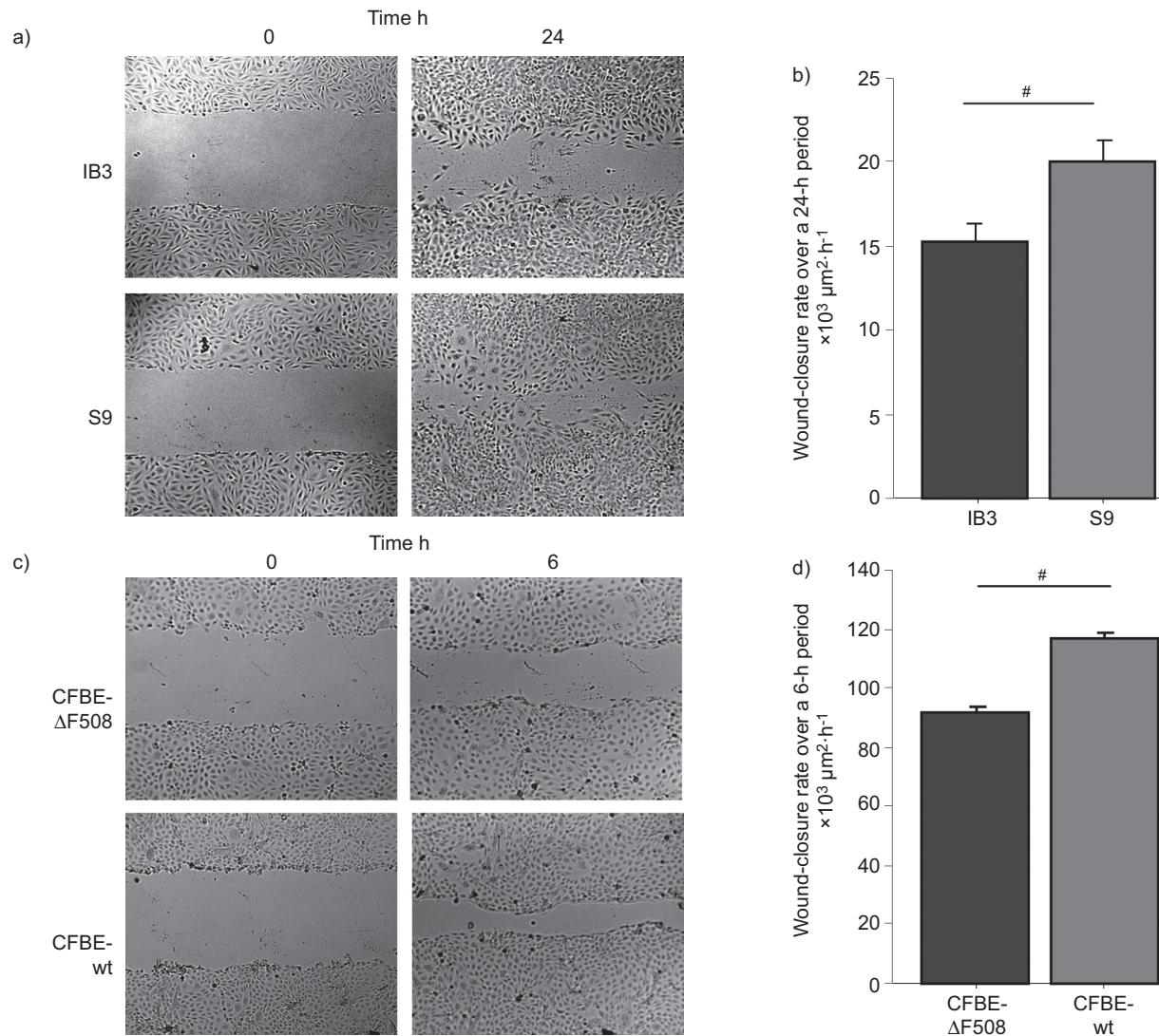
**DISCUSSION**

Our study first revealed extended epithelial damage and remodelling in bronchial sections taken from CF patients.

Despite the establishment of epithelial repair, in an attempt to restore the epithelial barrier, these mechanisms seem obviously insufficient to maintain a normal epithelial architecture. In fact, our results demonstrate that wound healing is delayed in CF epithelia compared with non-CF controls. In addition, our data suggest that functional CFTR channels are crucial for wound healing, as well as cell migration and proliferation processes. Interestingly, CFTR correction improves the wound-repair rates of CF cell monolayers. Taken together, our findings establish that CFTR is important in the early airway epithelial repair processes and highlights a new, unsuspected function of CFTR correctors that could improve the repair of damaged CF airway epithelia.



**FIGURE 5.** Decreased cell migration and proliferation after cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) inhibition in primary airway cell monolayers. a) Mean cell migration rate and trajectories (see representative tracks in b) were evaluated by single-cell tracking of subconfluent non-cystic fibrosis (CF) primary nasal cells (15 cells per condition) in control conditions or in the presence of GlyH101 (10 µM, 1-h pre-treatment, n=4; #: p<0.04). Scale bar=50 µm. c) Cell proliferation during wound repair of primary non-CF nasal cell monolayers was evaluated by Ki-67 immunostaining. Quantification of the number of Ki-67 positive cells (green cells), expressed as percentage of total cell number (4', 6-diamidino-6-phenylindole (DAPI)-positive blue cells), at 6-h and 18-h of repair reported under control and GlyH101 conditions (20 µM, 1-h pre-treatment, n=3; †: p<0.03). d) Representative photographs (×20 enlargement) of Ki-67 and DAPI staining, as well as merged images, under control conditions and in the presence of GlyH101 (at 18 h of repair). Scale bar=10 µm. See figure S2 for negative control and ×10 enlargement representative photographs.



**FIGURE 6.** Increased wound-healing capacity after cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) correction in cystic fibrosis (CF) cell lines. Wound-closure rates of b) the CF cell line IB3 and the IB3 cell line corrected with wild-type (wt)-CFTR (S9 cell line) ( $n=20$ ; #:  $p<0.0001$ ) and d) CFBE41o- cells overexpressing  $\Delta$ F508- or wt-CFTR (respectively, CFBE- $\Delta$ F508 and CFBE-wt,  $n=15$ ; #:  $p<0.0001$ ) were monitored over a 24-h and 6-h period, respectively. Representative photographs are presented in a) and c).

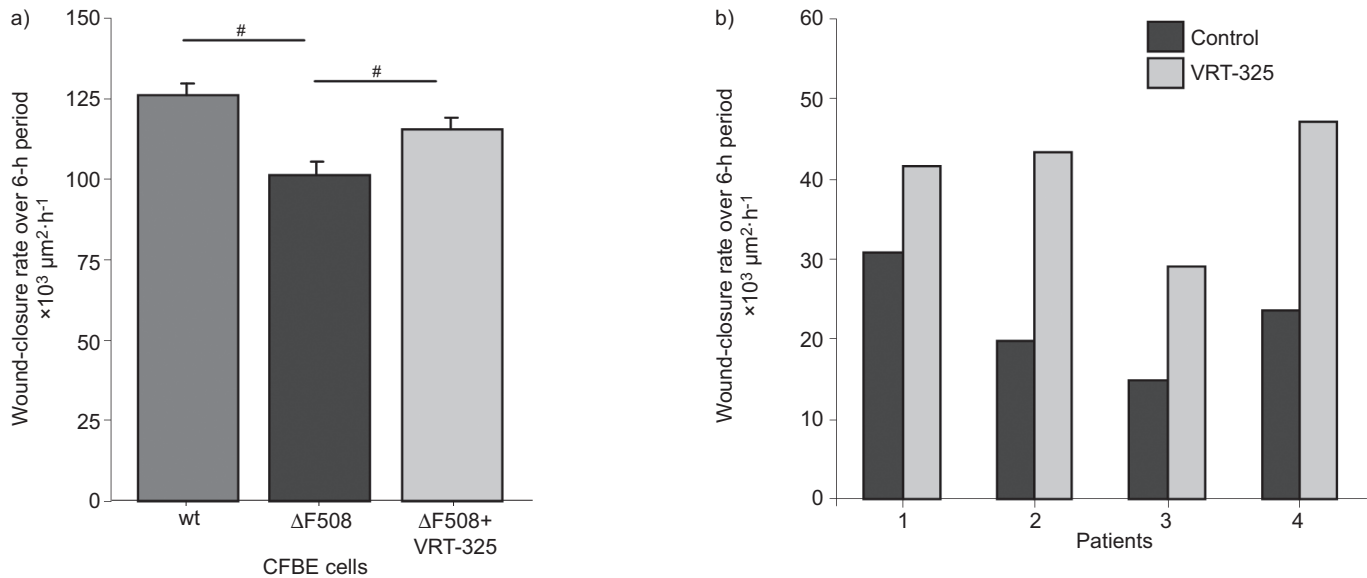
### Severity of epithelial injury and remodelling of CF airways

Our histological analysis of CF lung sections revealed significant tissue remodelling, including secretory and basal cell hyperplasia, gland hypertrophy, as well as squamous metaplasia, in most patients, in agreement with previous reports [3, 4, 7, 29, 30]. Our analysis also detected areas of extended and severe epithelial shedding in 100% of analysed CF patients. In 70% of patients, some areas retained a normal architecture, indicating that the severity of airway epithelial injury may be variable among areas and patients, even at the time of transplantation [4, 31]. In this study we focused on bronchial sections; however, previous papers also reported marked epithelial alterations in nasal upper airways [6, 32], trachea [6] and bronchioles [4, 5] as well as in alveoli [4, 33]. Previous ultrastructural analysis also revealed disorganisation of epithelial tight junctional complexes and dysmorphology of cilia [6, 34].

Although bronchiectasis is commonly correlated with loss of lung function in CF patients, other parameters, such as bronchial wall thickening, atelectasis-consolidation [35] and epithelial damage [34], are also associated with decline in FEV1 and poor clinical lung conditions. The lost epithelial integrity may favour bacterial adherence and colonisation [8–11]. Moreover, the loss of ciliated cells could worsen the already dysfunctional mucociliary clearance, while a decrease in the number of Clara and ATII cells may further affect the defence against pathogens [4–6, 30, 34]. These phenomena are thus creating a vicious circle of infections, inflammation and injury exacerbation, central to the progression of CF lung disease.

### Defective wound healing in CF airway monolayers

In two patients, we detected areas of partial bronchial epithelial repair. Alveolar epithelial regeneration in CF has also been reported elsewhere [5, 36]. Despite such evidence of



**FIGURE 7.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) correction with VRT-325 enhanced the wound-healing capacity of cystic fibrosis (CF) cell monolayers. a) CFBE-ΔF508 and CFBE-wild type (wt) cells ( $n=9$ ; #,  $p<0.002$ ), as well as b) primary human CF bronchial cell monolayers ( $n=4$ ;  $p<0.02$ ) were wounded and wound-closure rates were monitored over a 6-h period, either under control conditions or after CFTR rescue with treatment with VRT-325 (5  $\mu\text{M}$ ), for 18–24 h before injury.

epithelial repair, progressive lung tissue destruction and deterioration of clinical conditions [7, 34] was reported in CF patients. In fact, our *in vitro* data indicated that the wound-healing process is less effective in CF than in non-CF airways. Indeed, we found that wound-closure rates in the CF cell lines CuFi-1, IB3 and CFBE-ΔF508 were slower than in their related non-CF cell lines. More importantly, this delay was confirmed in primary cells from CF patients, suggesting a basic defect in CF wound healing, in a pathogen-free model. Moreover, it should be noted that the repair delay was observed in bronchial monolayers (a 63% difference compared with non-CF) from late-stage patients, with a long background of infections and/or exacerbation, as well as in nasal epithelial cell monolayers (53% decrease) from younger patients with early-stage disease. In agreement with our data, abnormal and delayed regeneration of human CF airway epithelium was also noted previously in a murine xenograft model that was free of infection [18]. Furthermore, in the airways of CF patients, the presence of virulence factors, proteases, oxidants and inflammatory mediators may further delay and consequently increase epithelial damage and remodelling.

#### Control of wound-healing processes by CFTR

CFTR inhibition or silencing elicited a decrease in wound healing of non-CF airway cell monolayers, demonstrating the role of CFTR in that phenomenon. The effect of channel inhibition by GlyH101 on wound closure, and cell migration and proliferation suggested that the CFTR conductance (and not only the protein *per se*) could be involved. However, the mechanisms whereby CFTR could control these repair mechanisms are not yet clearly defined. In fact,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  channels are important regulators of cell volume and intracellular calcium signalling required for proliferation and migration [37, 38]. Volume-dependent  $\text{Cl}^-$  channels, for example, are involved in the proliferation and migration of several cell types [39–41]. Moreover,  $\text{Cl}^-$  influx through  $\text{Cl}^-$

channels creates local swelling that is implicated in the formation of microglial lamellipodia [42]. Similarly, SCHILLER *et al.* [19] recently reported that CFTR downregulation in airway Calu-3 cells reduced wound healing and lamellipodia protrusion. In addition, CFTR activity has been shown to establish oriented electrical fields required to guide cell migration and promote wound healing in rhesus monkey trachea [43]. In our study, it should be noted that GlyH101 and CFTR siRNA did not completely depress wound repair. The partial effect of CFTR siRNA on wound healing could be explained by the partial silencing of CFTR expression. However, channels other than CFTR, especially  $\text{K}^+$  channels, participate in the control of airway epithelial repair, as we recently demonstrated [16, 17]. A cooperative role of  $\text{Cl}^-$  channels, favouring cell protrusion, and of  $\text{K}^+$  channels, necessary for retraction of cell bodies during cell migration, has been postulated [37].

Our data indicated that CFTR function could also regulate cell proliferation. Similarly, CFTR inhibition was shown to reduce kidney epithelial cell line (MDCK) cell proliferation [44]. However, higher cell proliferation was observed in regenerating CF epithelia in the xenograft model [18] and in CFTR null mice [45]. On the contrary, wt-CFTR overexpression in CFTR $^{-/-}$  mice increased lung secretory cell proliferation [46]. From data reported in the literature, it is thus not clear how CFTR dysfunction would impact cell proliferation. Moreover, several other parameters, including growth factors and inflammatory products, could also modulate cell proliferation and migration, and wound healing [47].

#### Improvement of wound healing after CFTR rescue

Our results showed, for the first time, that the CFTR corrector VRT-325 accelerated the wound closure in CFBE-ΔF508 monolayers, similarly to transduction with wt-CFTR in CF cell lines. Interestingly, the wound healing of primary human

bronchial cell monolayers was also strongly improved (by up to 1.8-fold) by VRT-325, showing its beneficial effect even in specimens from late-stage CF patients. Although nonspecific effects of VRT-325 cannot be excluded, recent data suggested that VRT-325 may directly bind to  $\Delta F508$ -CFTR [48]. Moreover, our results provide considerable evidence that CFTR controls the wound-healing process, indicating that improved wound closure after VRT-325 treatment may be related to CFTR upregulation.

In summary, our results, as well as recent data in the literature [19], provide strong proof that CFTR function is critical for airway epithelial wound healing *in vitro*. A basic CFTR defect could thus be responsible, at least in part, for the delayed wound closure in CF airway monolayers. Interestingly, our findings also indicated that CFTR correction significantly accelerates CF airway wound healing, suggesting that CFTR rescue could provide a new therapeutic approach to improve the early repair processes necessary to CF airways regeneration.

### SUPPORT STATEMENT

This study was funded by Cystic Fibrosis Canada (grant to E. Brochiero and studentship to N.T.N. Trinh), the Association Vaincre la Mucoviscidose (grant to C. Coraux), the programme d'échange internationaux, FRISQ-INSERM (E. Brochiero and C. Coraux), CRCHUM and Université de Montréal (scholarship to E. Brochiero and studentship to O. Bardou) and the training programme of the Respiratory Health Network and the CIHR (studentship to E. Maillé).

### STATEMENT OF INTEREST

None declared.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank R.J. Bridges (Dept of Physiology and Biophysics, Rosalind Franklin University, North Chicago, IL, USA) and Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics Inc. (CFFT) for providing GlyH101 and VRT-325, as well as J. Riordan and CFFT for CFTR antibodies. We also thank the laboratories of Y. Berthiaume (CRCHUM, Montreal, QC, Canada) and H. Hanrahan (McGill, Montreal) for help with the primary bronchial cells. Finally, we acknowledge the editorial work of O. Da Silva and A. Hollman on this manuscript and logistical assistance from the Research Support Office, CRCHUM.

### REFERENCES

- 1 Donaldson SH, Boucher RC. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9: 486–491.
- 2 Courtney JM, Ennis M, Elborn JS. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2004; 3: 223–231.
- 3 Shute J, Marshall L, Bodey K, et al. Growth factors in cystic fibrosis – when more is not enough. *Paediatr Respir Rev* 2003; 4: 120–127.
- 4 Hubeau C, Lorenzato M, Couetil JP, et al. Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa. *Clin Exp Immunol* 2001; 124: 69–76.
- 5 Dovey M, Wissemann CL, Roggli VL, et al. Ultrastructural morphology of the lung in cystic fibrosis. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1989; 21: 521–534.
- 6 Carson JL, Collier AM, Gambling TM, et al. Ultrastructure of airway epithelial cell membranes among patients with cystic fibrosis. *Hum Pathol* 1990; 21: 640–647.
- 7 Bedrossian CW, Greenberg SD, Singer DB, et al. The lung in cystic fibrosis. A quantitative study including prevalence of pathologic findings among different age groups. *Hum Pathol* 1976; 7: 195–204.
- 8 de Bentzmann S, Roger P, Puchelle E. *Pseudomonas aeruginosa* adherence to remodelling respiratory epithelium. *Eur Respir J* 1996; 9: 2145–2150.
- 9 de Bentzmann S, Plotkowski C, Puchelle E. Receptors in the *Pseudomonas aeruginosa* adherence to injured and repairing airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: S155–S162.
- 10 Tsang KW, Shum DK, Chan S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* adherence to human basement membrane collagen *in vitro*. *Eur Respir J* 2003; 21: 932–938.
- 11 Roger P, Puchelle E, Bajolet-Laudinat O, et al. Fibronectin and  $\alpha 5\beta 1$  integrin mediate binding of *Pseudomonas aeruginosa* to repairing airway epithelium. *Eur Respir J* 1999; 13: 1301–1309.
- 12 Sacco O, Silvestri M, Sabatini F, et al. Epithelial cells and fibroblasts: structural repair and remodelling in the airways. *Paediatr Respir Rev* 2004; 5: Suppl. A, S35–S40.
- 13 Boxall C, Holgate ST, Davies DE. The contribution of transforming growth factor- $\beta$  and epidermal growth factor signalling to airway remodelling in chronic asthma. *Eur Respir J* 2006; 27: 208–229.
- 14 Ingram JL, Bonner JC. EGF and PDGF receptor tyrosine kinases as therapeutic targets for chronic lung diseases. *Curr Mol Med* 2006; 6: 409–421.
- 15 Puddicombe SM, Polosa R, Richter A, et al. Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *FASEB J* 2000; 14: 1362–1374.
- 16 Trinh NT, Prive A, Kheir L, et al. Involvement of KATP and KvLQT1  $K^+$  channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L870–L882.
- 17 Trinh NT, Prive A, Maille E, et al. EGF and  $K^+$  channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295: L866–L880.
- 18 Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, et al. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J Pathol* 2007; 211: 340–350.
- 19 Schiller KR, Maniak PJ, O'Grady SM. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299: C912–C921.
- 20 Zabner J, Karp P, Seiler M, et al. Development of cystic fibrosis and noncystic fibrosis airway cell lines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: L844–L854.
- 21 Bebok Z, Collawn JF, Wakefield J, et al. Failure of cAMP agonists to activate rescued  $\Delta F508$  CFTR in CFBE41o- airway epithelial monolayers. *J Physiol* 2005; 569: 601–615.
- 22 Maille E, Trinh NT, Prive A, et al. Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF- $\alpha$  after injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011; 301: L945–L955.
- 23 Aarbiou J, Verhoosel RM, van Wetering S, et al. Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30: 193–201.
- 24 Geiser T, Jarreau PH, Atabai K, et al. Interleukin-1 $\beta$  augments *in vitro* alveolar epithelial repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L1184–L1190.
- 25 Pedemonte N, Lukacs GL, Du K, et al. Small-molecule correctors of defective  $\Delta F508$ -CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest* 2005; 115: 2564–2571.
- 26 Rowe SM, Pyle LC, Jurkevante A, et al.  $\Delta F508$  CFTR processing correction and activity in polarized airway and non-airway cell monolayers. *Pulm Pharmacol Ther* 2010; 23: 268–278.
- 27 Van Goor F, Straley KS, Cao D, et al. Rescue of  $\Delta F508$ -CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: L1117–L1130.
- 28 Wang Y, Loo TW, Bartlett MC, et al. Additive effect of multiple pharmacological chaperones on maturation of CFTR processing mutants. *Biochem J* 2007; 406: 257–263.
- 29 Brownlee KG. Small airways disease in cystic fibrosis. *Eur Respir Mon* 2006; 35: 21–37.



- 30 Simel DL, Mastin JP, Pratt PC, *et al.* Scanning electron microscopic study of the airways in normal children and in patients with cystic fibrosis and other lung diseases. *Pediatr Pathol* 1984; 2: 47–64.
- 31 Sobonya RE, Taussig LM. Quantitative aspects of lung pathology in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 290–295.
- 32 Knipping S, Holzhausen HJ, Riederer A, *et al.* Cystic fibrosis: ultrastructural changes of nasal mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007; 264: 1413–1418.
- 33 Hollande E, Cantet S, Ratovo G, *et al.* Growth of putative progenitors of type II pneumocytes in culture of human cystic fibrosis alveoli. *Biol Cell* 2004; 96: 429–441.
- 34 Piorunek T, Marszalek A, Biczysko W, *et al.* Correlation between the stage of cystic fibrosis and the level of morphological changes in adult patients. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59: Suppl. 6, 565–72.
- 35 Oikonomou A, Manavis J, Karagianni P, *et al.* Loss of FEV<sub>1</sub> in cystic fibrosis: correlation with HRCT features. *Eur Radiol* 2002; 12: 2229–2235.
- 36 Hardie WD, Bejarano PA, Miller MA, *et al.* Immunolocalization of transforming growth factor  $\alpha$  and epidermal growth factor receptor in lungs of patients with cystic fibrosis. *Pediatr Dev Pathol* 1999; 2: 415–423.
- 37 Schwab A, Nechyporuk-Zloy V, Fabian A, *et al.* Cells move when ions and water flow. *Pflugers Arch* 2007; 453: 421–432.
- 38 Kirk KL. CFTR channels and wound healing. Focus on "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair". *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299: C888–C890.
- 39 Cheng G, Kim MJ, Jia G, *et al.* Involvement of chloride channels in IGF-I-induced proliferation of porcine arterial smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 198–207.
- 40 Mao J, Chen L, Xu B, *et al.* Suppression of ClC-3 channel expression reduces migration of nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 1706–1716.
- 41 Mao J, Chen L, Xu B, *et al.* Volume-activated chloride channels contribute to cell-cycle-dependent regulation of HeLa cell migration. *Biochem Pharmacol* 2009; 77: 159–168.
- 42 Zierler S, Frei E, Grissmer S, *et al.* Chloride influx provokes lamellipodium formation in microglial cells. *Cell Physiol Biochem* 2008; 21: 55–62.
- 43 Sun YH, Reid B, Fontaine JH, *et al.* Airway epithelial wounds in rhesus monkey generate ionic currents that guide cell migration to promote healing. *J Appl Physiol* 2011; 111: 1031–1041.
- 44 Li H, Findlay IA, Sheppard DN. The relationship between cell proliferation, Cl<sup>-</sup> secretion, and renal cyst growth: a study using CFTR inhibitors. *Kidney Int* 2004; 66: 1926–1938.
- 45 Gallagher AM, Gottlieb RA. Proliferation, not apoptosis, alters epithelial cell migration in small intestine of CFTR null mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G681–G687.
- 46 Larson JE, Delcarpio JB, Farberman MM, *et al.* CFTR modulates lung secretory cell proliferation and differentiation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L333–L341.
- 47 Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 298: L715–L731.
- 48 Kim CP, Wellhauser L, Huan LJ, *et al.* A chemical corrector modifies the channel function of F508del-CFTR. *Mol Pharmacol* 2010; 78: 411–418.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* on CFTR function in airway epithelial cells

NGUYEN THU NGAN TRINH<sup>1,2</sup>, CLAUDIA BILODEAU<sup>1,2</sup>, ÉMILIE MAILLÉ<sup>1</sup>, MARIE-CLAUDE QUINTAL<sup>3</sup>, MARTIN-YVON DESROSIERS<sup>1</sup>, SIMON ROUSSEAU<sup>4</sup> AND EMMANUELLE BROCHIERO<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM),

<sup>2</sup>Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada,

<sup>3</sup>CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

<sup>4</sup>Meakins-Christie Laboratories, Department of Medicine, McGill University, Montreal, Canada

Corresponding author (and reprint request):

Emmanuelle Brochiero, Ph.D.

CRCHUM, Tour Viger

900 rue St-Denis

Montréal, Québec, Canada H2X09A

Telephone: 514-890-8000 extension 14691



Exposure of airway epithelial cell to *Pseudomonas aeruginosa* impairs CFTR function, expression and rescue by correctors

**ABSTRACT**

The epithelial response to bacterial airway infection, a common feature of lung diseases such as COPD and cystic fibrosis (CF), has been extensively studied. However, its impact on CFTR channel function is not clearly defined. Our aims were therefore to evaluate the effect of *Pseudomonas aeruginosa* on CFTR function and expression in non-CF airway epithelial cells, and to investigate its impact on  $\Delta F508$ -CFTR rescue by the VRT-325 corrector in CF cells.

CFTR expression/maturation was evaluated by immunoblotting and its function by short-circuit current measurements. A 24h exposure to *P. aeruginosa* diffusible material (PsaDM) reduced CFTR currents and the level of both mature and immature bands of the wt-CFTR protein in CFBE-wt cells. In CFBE- $\Delta F508$  cells, PsaDM severely reduced CFTR maturation and current rescue induced by VRT-325. We also confirmed a deleterious impact of PsaDM on wt-CFTR currents in non-CF primary airway cells as well as on the rescue of  $\Delta F508$ -CFTR function induced by VRT-325 in primary CF cells.

These findings show that CFTR function could be impaired in non-CF patients infected by *P. aeruginosa*. Our data also suggest that CFTR corrector efficiency may be affected by infectious components, which should be taken into account in screening assays of correctors.

**KEYWORDS:** airways, CFTR, CFTR corrector, expression, function, currents, infection

## INTRODUCTION

Chloride and bicarbonate secretion through cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channels is crucial in airways to maintain an adequate periciliary liquid volume and an efficient mucociliary clearance [1], as well as to control airway surface liquid pH [2], which are necessary to protect the lung against infections. Despite these mechanisms of defence, lungs are frequently exposed to infection/inflammation, which are common features of several lung pathologies including chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and cystic fibrosis (CF). The impact of infection on airway epithelia has been extensively studied and it has been established that the continuous presence of pathogens is associated with oxidative stress and chronic inflammatory responses [3-5]. However, the consequences of exposure to infections on CFTR channel expression and function have not been clearly defined. In fact, contradictory results have been reported depending on the bacterial strain, the duration of exposure to infection, as well as the cellular models tested [6-9]. However, it is crucial to understand the outcomes of microbial infection on CFTR. Indeed, a decrease of CFTR function in airways of infected patients would further reduce defence against infections, thus creating a vicious circle of infections impairing CFTR, resulting in CFTR dysfunction favouring infections.

In cystic fibrosis, due to mutations in the *Cftr* gene, dysfunctional CFTR is associated with reduced periciliary volume and mucus accumulation, favouring bacterial colonization and chronic inflammation [5;10]. The prevalence of respiratory pathogens in CF patients varies as a function of age, but the most frequently found bacteria in adults are *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), which gradually colonize CF airways [11]. Many of the current therapies in CF are thus directed against infection as well as towards attenuating the inflammatory response [12;13]. In addition, many efforts have recently been put towards the development of new strategies directly targeting the basic CFTR defects rather than CF symptoms [14;15]. New therapies, adapted to each specific class of mutations, are thus progressively emerging. Among them, small molecules called correctors are directed against class II mutations, including the most frequent mutation in CF patients, a deletion of F508 ( $\Delta$ F508-CFTR) leading to improper folding, ER trapping and protein degradation [14;15]. Efficient CFTR maturation and delivery to the cell

1  
2  
3 membrane has been reported after treatment with various corrector molecules, including  
4 corr-2b, corr-4a, VRT-325, MPB-07, C18 and VX-809 [16-24]. However, to the best of  
5 our knowledge most high throughput screening assays to identify efficient corrector  
6 molecules are performed in the absence of infectious products. Notably, it has been  
7 previously reported that *P. aeruginosa* exposure reduced CFTR rescue induced by low  
8 temperature [6]. Because microbial infection is a key component of CF lung disease, it  
9 would thus be crucial to assess the efficiency of small molecules targeting CFTR defects  
10 in the presence of infection.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

18 The aim of this study was first to evaluate the impact of *P. aeruginosa* diffusible  
19 material (PsaDM) on CFTR function and expression in non-CF airway epithelial cells,  
20 and second to assess if *P. aeruginosa* exoproducts could affect KF508-CFTR maturation  
21 and functional rescue by the CFTR corrector VRT-325 in CF airway cells.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## MATERIALS AND METHODS

### *Cell culture*

CFBE- $\Delta$ F508 and CFBE-wt cell lines (CFBE41o- parental cells [25] stably transduced, respectively, with  $\Delta$ F508-CFTR and with wt-CFTR [26]) were used initially. Primary human airway cells were isolated from tissues obtained from non-CF and CF patients (with class II mutations, including KF508/KF508 and KF508/N1303K, median age 23 yrs, mean FEV<sub>1</sub> of 82  $\pm$  9%) undergoing nasal polypectomy at CHUM and CHU Ste-Justine hospitals (Montréal, QC, Canada) [27], according to approved ethical protocols. Cell isolation and culture conditions are detailed in the online supplementary material.

### *Preparation of P.aeruginosa diffusible material (PsaDM)*

Briefly, *P.aeruginosa* mucoid strain PA508 was isolated from the sputum of a CF patient (KF508/KF508, CHU Ste-Justine, Montréal) and was grown in lysogeny broth medium (LB, Life Technologies) for 72h at 37°C with shaking at 250 RPM. The bacterial culture was then centrifuged and the supernatant was filtered successively through 0.8Pm-, 0.45Pm- and 0.2Pm filters [28]. LB was used as the control condition.

### *Immunoblotting*

Total proteins were extracted from CFBE cells treated or not with VRT-325 (Cystic Fibrosis Foundation Therapeutic Inc., CFFT), LB, PsaDM, cycloheximide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and/or with MG132 (Abmole Bioscience, Kowloon, Honk Hong). For CFTR detection [27], the upper section of the membrane was incubated with the polyclonal anti-CFTR 596 antibody (CFFT), whereas the bottom section was incubated with purified mouse anti- $\beta$ -actin monoclonal antibody (Cedarlane Laboratory, Burlington, ON, Canada) to ensure equivalent loading and for signal normalization.

### *Electrophysiology*

1  
2  
3 Short-circuit currents ( $I_{sc}$ ) [29-31] were measured through CFBE and primary  
4 airway cells [27] that had been cultured on coated permeant filters until they reached an  
5 air-liquid interface and formed a polarized epithelium with high resistance [32;33].  
6 Measurements were performed (see supplementary material for details) on intact  
7 monolayers or through apical membranes after permeabilization of the basolateral side  
8 with 7.5  $\mu$ M amphotericin B (Sigma-Aldrich), in the presence of a symmetrical  
9 physiological solution or a  $Cl^-$  gradient, as indicated in figure legends.  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16

### 17 ***CFTR mRNA expression***

18  
19 Total RNA from CFBE cells treated with PsaDM or LB was purified with TRIzol  
20 reagent (Life Technologies) [27] and CFTR mRNA expression was evaluated by qPCR  
21 as described in supplementary material. The expression of CFTR was reported as  
22 percentage relative to cells with LB.  
23  
24  
25  
26

### 27 ***Statistics***

28  
29 The data are presented as means  $\pm$  SE. Groups were compared by paired *t*-test or  
30 non-parametric Wilcoxon test, as indicated, with Statview (SAS Institute, Cary, NC,  
31 USA) and GraphPad (La Jolla, CA, USA) software, respectively. A probability of  $p < 0.05$   
32 was considered to be significant.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## RESULTS

### *Decrease in CFTR function induced by P.aeruginosa exoproducts*

We first evaluated the impact of *P. aeruginosa* diffusible material (PsaDM) on CFTR function in polarized airway epithelial CFBE-wt cell monolayers grown on permeant filters. Cells were treated with either LB (control) or PsaDM for a 24h period before short-circuit current measurements. Just before mounting in an Ussing chamber, intact cell monolayers were washed and bathed in a symmetrical physiological solution containing amiloride in order to inhibit Na<sup>+</sup> currents through ENaC channels. Forskolin, IBMX and genistein were then applied at the apical membrane to stimulate cAMP-activated Cl<sup>-</sup> secretion through CFTR channels, which was finally inhibited by the CFTR<sub>Inh-172</sub> (**Fig. 1A**). We observed that the change in short-circuit current ( $\Delta I_{short-circuit}$ ) after CFTR activation/potentialiation ( $\Delta I_{Fsk+IBMX} + \Delta I_{Genistein}$ ) was significantly reduced in the presence of PsaDM ( $0.7 \pm 0.3$  PA/cm<sup>2</sup>) when compared to the LB control ( $2.0 \pm 0.5$  PA/cm<sup>2</sup>,  $p < 0.02$ , **Figs. 1A and B**). Similarly, CFTR<sub>Inh-172</sub>-sensitive CFTR current ( $\Delta I_{CFTRInh-172}$ ) was also markedly affected by exposure to PsaDM ( $-1.2 \pm 0.4$  PA/cm<sup>2</sup>) compared to  $-2.8 \pm 0.6$  PA/cm<sup>2</sup> for LB,  $p < 0.02$ , **Figs. 1A and 1B**). It must be noted that higher CFTR current was measured after establishment of a Cl<sup>-</sup> gradient; however it was also reduced by PsaDM treatment (see traces in **supplementary Figure S1**).

### *Decrease in CFTR expression induced by P.aeruginosa exoproducts*

We then investigated if the observed decrease in CFTR function induced by *P. aeruginosa* exoproducts in CFBE cells was associated with reduced CFTR expression. We first tested the impact of PsaDM on CFTR mRNA expression in non-CF CFBE-wt cells as well as in CF CFBE- $\Delta$ F508 cells. As shown in **Fig. 2A**, the number of CFTR mRNA copies measured by real-time PCR in CFBE-wt remains unchanged in the presence of PsaDM (NS). Meanwhile, PsaDM slightly decreased the level of expression of CFTR mRNA in CFBE- $\Delta$ F508 ( $p < 0.006$ ).

We then assessed the impact of PsaDM on CFTR protein expression by immunoblotting. As expected, immature and mature CFTR bands (band B and C, respectively) were detected in CFBE-wt cells (**Fig. 2B**, left panel), while the immature band B only was visible in lysates from CFBE- $\Delta$ F508 cells expressing the  $\Delta$ F508-CFTR



1  
2  
3 mutant protein (**Fig. 2B**, right panel). It was then noted that the intensity of both bands in  
4 CFBE-wt was severely reduced in the presence of PsaDM (by 73% and 40%,  
5 respectively,  $p<0.04$ ), when compared to LB control (**Fig. 2B**, left panel). In CFBE-  
6  $\Delta$ F508 cells, the immature form of CFTR was also affected by PsaDM exposure (57%  
7 decrease,  $p<0.0002$ , **Fig. 2B**, right panel). Taken together, these results demonstrated that  
8 bacterial exoproducts affected both CFTR expression and function.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

### 16 ***Impact of P.aeruginosa exoproducts on CFTR protein degradation and synthesis***

17  
18 In order to define if the observed decrease in CFTR protein level in the presence  
19 of PsaDM could be due to enhanced protein degradation, we blocked protein translation  
20 by exposing CFBE-wt cells to cycloheximide for 0, 2, 8, 18, 24 and 32h, in the presence  
21 or absence of PsaDM. We then measured the remaining level of CFTR protein by  
22 immunoblotting. As illustrated on **Fig. 3A**, the decrease in CFTR protein abundance  
23 following 8h, 18h and 32h cycloheximide treatments was slightly, but significantly,  
24 higher in the presence of PsaDM ( $p<0.05$ ). However, this potential increase in CFTR  
25 degradation after exposure to PsaDM may not be sufficient to explain the large decrease  
26 in CFTR protein level shown in **Fig. 2B**. A possible impact of PsaDM on CFTR synthesis  
27 was thus assessed by exposing CFBE-wt cells to MG132, a proteasomal inhibitor, for 0,  
28 2, 8 and 18 h, in the presence or absence of PsaDM and then measuring the accumulation  
29 of CFTR protein by immunoblotting. We observed (**Fig. 3B**) that the accumulation of wt-  
30 CFTR protein bands B and C was higher under control conditions (LB) than in the  
31 presence of PsaDM ( $p<0.04$ ), suggesting that *P. aeruginosa* exoproducts could reduce  
32 CFTR protein synthesis.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

### 46 ***Impaired CFTR rescue in the presence of P.aeruginosa exoproducts***

47  
48 In the light of this evidence pointing towards a deleterious effect of PsaDM on  
49 CFTR function and expression, we then decided to investigate if PsaDM had an impact  
50 on the ability of the CFTR corrector VRT-325 to rescue  $\Delta$ F508-CFTR maturation and  
51 function in CF cells. As previously reported [27], we first confirmed that VRT-325  
52 partially rescued CFTR mature band C protein expression (**Fig. 4A**, LB lane) as well as  
53 CFTR currents through the apical membrane of CFBE-KF508 cell monolayers (**Fig. 4B**,  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 left panel). Indeed, short-circuit current measurements revealed that CFBE- $\Delta$ F508 cell  
4 monolayers treated for 24h with VRT-325 elicited significant cAMP-activated  $\text{Cl}^-$   
5 currents, sensitive to the  $\text{CFTR}_{\text{Inh172}}$  (**Fig. 4B**, left panel).  
6  
7

8  
9 In the presence of PsaDM, we noted, however, a drastic decrease in band C  
10 maturation (~70% inhibition compared to the signal in the LB control,  $p < 0.0004$ , **Fig.**  
11 **4A**, PsaDM). The outcome of PsaDM on the rescue of  $\Delta$ F508-CFTR channel function by  
12 VRT-325 was then assessed by comparing short-circuit currents through CFBE- $\Delta$ F508  
13 cell monolayers treated with VRT-325 in the presence of either LB or PsaDM for 24h. As  
14 shown in **figures 4B** and **4C**, cAMP-activated  $\text{Cl}^-$  secretion following CFTR  
15 activation/potentialiation ( $\Delta I_{\text{Fsk+IBMX+Genistein}}$ ) was notably decreased in PsaDM  
16 (PsaDM+VRT-325,  $0.5 \pm 0.3 \text{ PA/cm}^2$ ) when compared to LB control (LB+VRT-325,  
17  $2.2 \pm 0.4 \text{ PA/cm}^2$ ,  $p < 0.01$ ). Furthermore,  $\text{CFTR}_{\text{Inh172}}$ -sensitive CFTR currents in the  
18 presence of PsaDM were also smaller than in LB control ( $-0.9 \pm 0.2 \text{ PA/cm}^2$  vs.  $-3.9 \pm 0.4$   
19  $\text{PA/cm}^2$ , respectively in PsaDM and LB,  $p < 0.0001$ , **Fig. 4C**). These results indicated that  
20 the rescue of  $\Delta$ F508-CFTR channel function by the CFTR corrector VRT-325 is strongly  
21 impaired by *P. aeruginosa* exoproducts.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

### 34 ***Deleterious impact of P. aeruginosa exoproducts on CFTR function in primary human*** 35 ***airway epithelial cells*** 36

37 The effect of PsaDM on CFTR function was finally assessed in primary human  
38 airway epithelial cells isolated from non-CF and CF patients. In non-CF airway cells, we  
39 confirmed a significant reduction in cAMP-activated  $\text{Cl}^-$  secretion ( $\Delta I_{\text{Fsk+IBMX}}$  of  $13.9 \pm 3.5$   
40 vs.  $8.9 \pm 2.7 \text{ PA/cm}^2$ , respectively under LB and PsaDM conditions,  $p < 0.05$ ), as well as  
41  $\text{CFTR}_{\text{Inh172}}$ -sensitive ( $\Delta I_{\text{CFTRinh-172}}$ ,  $-18.5 \pm 3.1 \text{ PA/cm}^2$  in LB vs.  $-13.5 \pm 3.1 \text{ PA/cm}^2$  in  
42 PsaDM) CFTR currents by *P. aeruginosa* exoproducts (**Fig 5**). Moreover, the rescue of  
43 CFTR currents in CF airway primary cells, induced by VRT-325, was also impaired in  
44 the presence of PsaDM ( $\Delta I_{\text{Fsk+IBMX}}$  of  $1.1 \pm 0.4 \text{ PA/cm}^2$  vs.  $0.4 \pm 0.4 \text{ PA/cm}^2$ , respectively in  
45 the presence of LB or PsaDM,  $p < 0.03$ , **Fig. 6**).  $\text{CFTR}_{\text{Inh172}}$ -sensitive CFTR currents were  
46 also slightly reduced in the presence of PsaDM.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## DISCUSSION

Altogether, our data demonstrated that exoproducts from *P. aeruginosa* impacted CFTR function in both CFBE-wt cells and primary human airway epithelial cells isolated from non-CF patients. A decrease in CFTR protein expression was also observed, which could be due to enhanced protein degradation and reduced protein synthesis. Importantly, our study also revealed that the functional rescue of KF508-CFTR by the CFTR corrector VRT-325 in CFBE-KF508 cells and CF primary human airway epithelial cells was impaired in the presence of bacterial products.

### *Impaired CFTR function by infectious products*

Our Ussing chamber experiments on CFBE-wt cells presented in **Fig. 1** demonstrated that a 24 h exposure to diffusible materials from a clinical isolate of *P. aeruginosa* (PA508 strain) induced a significant reduction in cAMP-activated Cl<sup>-</sup> currents through CFTR channels. Similarly, Swiatecka-Urban *et al.* [6] previously reported that a 4-6 h period incubation with a culture of a *P. aeruginosa* laboratory isolate (PA14) reduced CFTR-mediated transepithelial Cl<sup>-</sup> secretion through Calu-3 cells as well as CFBE41o- cells stably expressing wt-CFTR. Importantly, we now confirmed the deleterious impact of a 24 h exposure to *P. aeruginosa* exoproducts in differentiated primary cultures of non-CF human airway cells (**Fig. 5**). In contrast with these data, it has been shown that acute (15 min) application of *P. aeruginosa* (PA14) or purified LPS increased the rate of iodide efflux, an index of Cl<sup>-</sup> secretion, through 2WT2 epithelial cells expressing wt-CFTR [9]. Furthermore, Buyck *et al.* [34] have shown that *P. aeruginosa* LPS stimulated Cl<sup>-</sup> currents through CFTR channels in 16HBE14o- cells, probably via a calcium signal. Similarly, N-(3-oxo-dodecanoyl)-S-homoserine lactone (3O-C12), a quorum sensing molecule secreted by *P. aeruginosa*, has been shown to rapidly enhance Cl<sup>-</sup> and fluid secretion as well as cytosolic Ca<sup>2+</sup> and cAMP levels [35]. It has also been reported that *P. aeruginosa* flagellin activated CFTR-dependent anion secretion in Calu-3 (through p38 signalling) as well as in primary cultures of human bronchial epithelial cells [36]. Most of these observations were interpreted as an attempt by airway epithelia to rapidly react to bacterial infection by increasing CFTR-dependent

1  
2  
3 ion and fluid flow necessary for bacterial clearance from the airways. Notably, whereas  
4 pyocyanine (N-methyl-1-hydroxyphenazine) slightly activated basal Cl<sup>-</sup> secretion through  
5 CFBE-wt cells, this redox-active virulence factor produced by *P. aeruginosa*, severely  
6 inhibited forskolin-stimulated Cl<sup>-</sup> secretion [37]. Our results, as well as data from the  
7 literature, thus indicated that the effects of *P. aeruginosa* infection may be time- and  
8 model-dependent. Moreover, different *P. aeruginosa* products/virulence factors present  
9 in PsaDM could be responsible for the observed effects, and further studies would be  
10 necessary to clearly define their mechanisms of actions.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

### 20 ***Impact of infection on CFTR expression***

21 In order to determine if the decrease in CFTR function after chronic exposure to  
22 *P. aeruginosa* products could be due to a decrease in CFTR expression, we then  
23 undertook PCR and immunoblot measurements to assess changes in CFTR mRNA and  
24 protein expression in CFBE-wt cells. Whereas the level of wt-CFTR mRNA was not  
25 affected after a 24 h treatment with PsaDM, we observed that both immature (band B)  
26 and mature (band C) CFTR proteins were severely reduced in CFBE-wt cells. In contrast  
27 with our results, a previous study [6] indicated that live *P. aeruginosa* bacteria (PA14  
28 strain, 4-6 h of infection) had no effect on total cellular expression of wt-CFTR.  
29 However, it was shown that PA14 decreased the expression of wt-CFTR in the apical  
30 membrane, which is in agreement with the reduced function of CFTR observed under  
31 infectious conditions in that study [6] as well as in ours. Various products secreted by *P.*  
32 *aeruginosa* have also been shown to have an impact on CFTR expression and function.  
33 Pyocyanin, for example, was found to inhibit CFTR expression at the apical membrane of  
34 airway epithelial cells [38]. The PA2394 protein (called CFTR inhibitory factor, Cif)  
35 secreted by *P. aeruginosa* is also involved in the reduction of CFTR apical membrane  
36 expression [39]. A model was then proposed where Cif secretion in *P.aeruginosa* outer  
37 membrane vesicles may reduce USP10-mediated deubiquitination of CFTR and  
38 secondarily increase the degradation of CFTR in lysosomes [40]. In agreement with  
39 CFTR degradation induced by infection, our results observed in the presence of  
40 cycloheximide presented at **Fig. 3** indicated that the kinetics of wt-CFTR protein  
41 degradation could be slightly faster in the presence of PsaDM, compared to control  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 conditions. However, this effect may not be sufficient to explain the huge inhibition of  
4 CFTR protein expression induced by PsaDM shown in **Fig. 2**. In fact, our data obtained  
5 in the presence of MG132 indicated that CFTR synthesis may also be affected by  
6 PsaDM. Our study, as well as data from the literature, thus indicated that *P. aeruginosa*  
7 exoproducts may impact CFTR protein synthesis, degradation and trafficking/recycling.  
8 A reduction in CFTR protein expression and function in non-CF airways exposed to  
9 chronic infection, for example in COPD patients, may have a negative impact on  
10 mucociliary clearance and consequently on the ability of airways to clear bacteria. This  
11 phenomenon could thus create a vicious circle of infection impairing CFTR, and  
12 dysfunctional CFTR favouring infection.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

### 22 ***Impaired $\Delta F508$ -CFTR rescue in the presence of infection***

23  
24 Our immunoblot experiments on CFBE-KF508 cells first revealed that the  
25 immature band B of KF508-CFTR was decreased by a 24 h exposure to PsaDM.  
26 Furthermore, immunoblot and Ussing chamber measurements showed for the first time  
27 that *P. aeruginosa* exoproducts severely affected the ability of the CFTR corrector VRT-  
28 325 to rescue KF508-CFTR maturation and function in CFBE-KF508 cells as well as in  
29 CF primary airway epithelial cells. These results are in agreement with a previous study  
30 [6] indicating that *P. aeruginosa* PA14 bacteria decreased CFTR currents induced by low  
31 temperature rescue in CFBE cells expressing KF508-CFTR.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

39 Altogether, these data thus indicated that the presence of infection in CF patients  
40 may impair the ability of CFTR correctors to rescue the basic CFTR defect. These  
41 observations are thus critical to future screenings of CFTR correctors that should take  
42 into account the infectious component, in order to select small corrector molecules that  
43 could be efficient despite the presence of pathogens.  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**SUPPORT STATEMENT**

This study was funded by Cystic Fibrosis Canada, CRCHUM and Université de Montréal (E Brochiero), the Canadian Thoracic Society, the Fondation GO and the CORAMH (NTN Trinh).

**STATEMENT OF CONFLICT OF INTEREST**

None declared

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We acknowledge Dr. RJ Bridges (Rosalind Franklin University) and CFFT for providing VRT-325 as well as Dr. J. Riordan and CFFT for CFTR Ab596. We thank the Biobank of respiratory tissues of CRCHUM/IRCM of the Respiratory Health Network of FRQS. Finally, we acknowledge the logistical assistance from the Research Support Office, CRCHUM.

**FIGURE LEGENDS:**

**Figure 1. Decrease of CFTR function after PsaDM treatment in CFBE-wt airway cell monolayers.** CFBE-wt cells were cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated for 24 h with either 10% of LB or *P. aeruginosa* filtrate (Psa diffusible material, PsaDM) before short-circuit current measurements ( $I_{short-circuit}$ ) in an Ussing chamber. Intact cell monolayers were bathed in a symmetrical physiological medium containing 10 PM amiloride, and then sequentially exposed to a combination of 10 PM forskolin and 100 PM IBMX, followed by 30 PM genistein and, finally, 20 PM CFTR<sub>Inh-172</sub> (CFFT Inc.). Representative  $I_{short-circuit}$  traces are reported for each condition (LB and PsaDM) in (A) while quantification of the mean  $KI_{Fk+IBMX+Genistein}$  and  $KI_{CFTRInh172}$  short-circuit currents (in PA/cm<sup>2</sup>) after LB and PsaDM exposure is reported in (B). n=5,  $p<0.02$ .

**Figure 2. Decrease of CFTR mRNA and protein expression after PsaDM treatment.** CFBE-wt and CFBE-KF508 cells were cultured for 8 days (until confluence was reached), then treated with either 10% of LB or PsaDM for 24 h. Levels of CFTR mRNA (A, CFBE-wt, n=8, NS and CFBE-KF508, n=5,  $p<0.006$ ) and protein expression (B, n=5,  $p<0.04$ ) were quantified and reported as % of the LB control. Representative immunoblots are also presented in B.

**Figure 3. Impact of PsaDM treatment on degradation and synthesis of CFTR protein in CFBE-wt airway cell monolayers.** A. CFBE-wt cells were cultured until confluence was reached (8 days), then treated with 100 µg/ml of cycloheximide (for 2, 8, 18, 24 and 32h, A, n=6,  $p<0.05$ ) or with 5 PM of MG132 (for 2, 8 and 18 h, B, n=11,  $p<0.04$ ), in the presence of 10% LB or PsaDM. The whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE separation and analysed by immunoblotting with anti-β-actin (used as loading control) and anti-CFTR antibodies to evaluate the kinetics of CFTR protein degradation in the presence of cycloheximide (A) and the accumulation of newly synthesized CFTR protein in the presence of the proteasomal inhibitor MG132 (B).

1  
2  
3  
4 **Figure 4. Impairment of  $\Delta F508$ -CFTR functional rescue after PsaDM treatment. A.**  
5 CFTR band C protein expression in CFBE-KF508 cells treated with 5 PM VRT-325 for  
6 24 h in the presence of 10% LB or PsaDM was quantified and reported as % of the LB  
7 control (n=5,  $p < 0.0005$ ). A representative immunoblot is also presented in the left panel.  
8 Short-circuit currents ( $I_{short-circuit}$ ) were measured in an Ussing chamber through CFBE-  
9 KF508 cells, cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated for 24 h  
10 with VRT-325 in combination with either 10% LB or PsaDM. After mounting in an  
11 Ussing chamber, cells were bathed with an asymmetrical physiological solution (low  $Cl^-$   
12 concentration solution at the apical side and high  $Cl^-$  concentration at the basolateral side)  
13 and the basolateral side was permeabilized with 7.5 PM amphotericin B. Upon  $I_{sc}$   
14 stabilization, cells were treated with a mix of forskolin, IBMX and genistein, and then  
15 with 20 PM CFTR<sub>Inh-172</sub>. Representative  $I_{short-circuit}$  traces are reported for each condition  
16 in (B) while quantifications of the mean  $KI_{Fk+IBMX+Genistein}$  and  $KI_{CFTRInh172}$  short-circuit  
17 currents (in  $PA/cm^2$ ) after LB+VRT-325 and PsaDM+VRT-325 exposure are reported in  
18 (C, n=12,  $p < 0.0001$ ).  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

32 **Figure 5. Inhibition of wt-CFTR function after PsaDM treatment in non-CF human**  
33 **primary airway cell monolayers.** Short-circuit current measurements ( $I_{short-circuit}$ ) in an  
34 Ussing chamber were performed on non-CF human primary airway cell monolayers,  
35 cultured on permeant filters at the air-liquid interface, treated for 24 h with either 5% LB  
36 or PsaDM. After mounting in an Ussing chamber, cells were bathed with an  
37 asymmetrical physiological solution (low  $Cl^-$  physiological solution at the apical side and  
38 high  $Cl^-$  solution at the basolateral side), containing 10 PM amiloride. Upon  $I_{sc}$   
39 stabilization, cells were treated with a combination of forskolin and IBMX, followed by  
40 20 PM CFTR<sub>Inh-172</sub>. Representative  $I_{short-circuit}$  traces are reported for each condition (A,  
41 LB (upper panel) and PsaDM (lower panel)) while quantifications of the mean  $KI_{Fk+IBMX}$   
42 and  $KI_{CFTRInh172}$  short-circuit currents (in  $PA/cm^2$ ) after LB+VRT-325 and PsaDM+VRT-  
43 325 exposure are reported in (B, n=7,  $p < 0.05$ ).  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

55 **Figure 6. Inhibition of  $\Delta F508$ -CFTR functional rescue after PsaDM treatment in CF**  
56 **human primary airway cell monolayers.** Short-circuit current measurements ( $I_{short-$   
57  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4 *circuit*) in an Ussing chamber were performed on CF human primary airway cell  
5 monolayers, cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated for 24 h  
6 with 10 PM VRT-325 in combination with either 5% LB or PsaDM. After mounting in  
7 an Ussing chamber, filters were bathed with an asymmetrical physiological solution (low  
8 Cl<sup>-</sup> physiological solution at the apical side and high Cl<sup>-</sup> at the basolateral side),  
9 containing 10 PM amiloride. Upon *I<sub>sc</sub>* stabilization, the filters were treated with a  
10 combination of forskolin and IBMX, followed by 20 PM CFTR<sub>Inh-172</sub>. Representative  
11 *I<sub>short-circuit</sub>* traces are reported for each condition (**A**, LB (upper panel) and PsaDM (lower  
12 panel) while quantifications of the mean  $KI_{Fk+IBMX}$  and  $KI_{CFTRInh172}$  short-circuit currents  
13 (in PA/cm<sup>2</sup>) after LB+VRT-325 and PsaDM+VRT-325 exposure is reported in (**B**). n=6,  
14  $p<0.03$ .  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## References

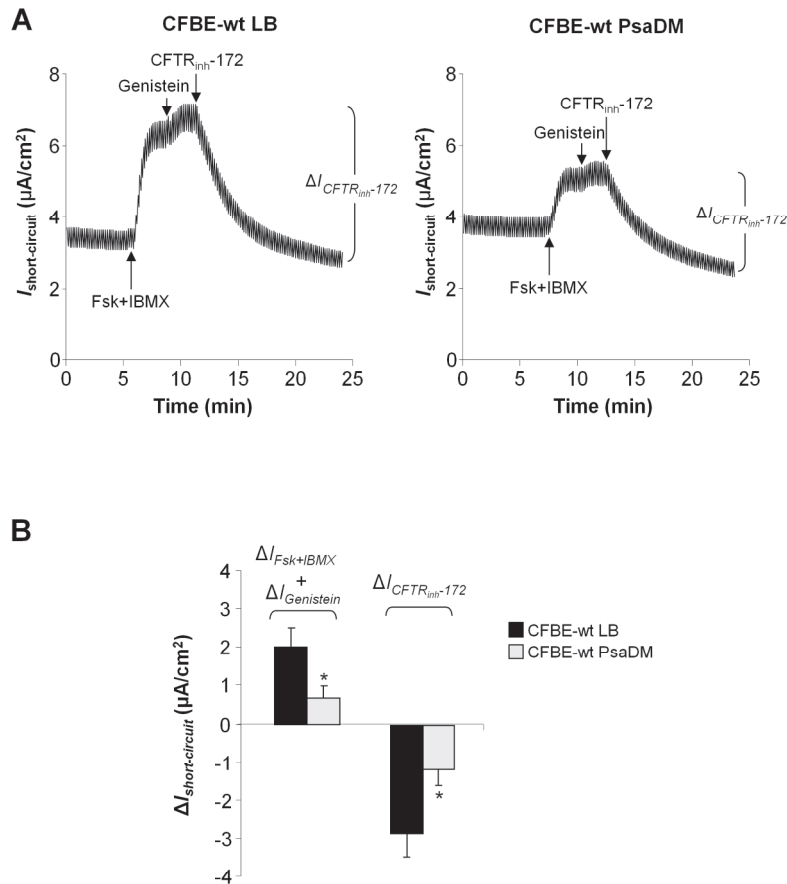
1. Boucher RC. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflugers Arch* 2003 January;445(4):495-8.
2. Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO, Karp PH, Wohlford-Lenane CL, Haagsman HP, van EM, Banfi B, Horswill AR, Stoltz DA, McCray PB, Jr., Welsh MJ, Zabner J. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* 2012 July 5;487(7405):109-13.
3. Jacquot J, Tabary O, Le Rouzic P, Clement A. Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(9):1703-15.
4. Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E, Zissler U, Rosewich M, Baer PC, Buhl R, Schmitt-Grohe S, Zielen S, Schubert R. Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. *Cytokine* 2010 May;50(2):152-7.
5. Cohen-Cymerknoh M, Kerem E, Ferkol T, Elizur A. Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications. *Thorax* 2013 December;68(12):1157-62.
6. Swiatecka-Urban A, Moreau-Marquis S, Maceachran DP, Connolly JP, Stanton CR, Su JR, Barnaby R, O'toole GA, Stanton BA. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits endocytic recycling of CFTR in polarized human airway epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006 March;290(3):C862-C872.
7. Zahm JM, Delavoie F, Toumi F, Nawrocki-Raby B, Kileztky C, Michel J, Balossier G, Johnson M, Coraux C, Birembaut P. Long acting beta2-agonist and corticosteroid restore airway glandular cell function altered by bacterial supernatant. *Respir Res* 2010;11:6.
8. Le GM, Descamps D, Roussel D, Saussereau E, Guillot L, Ruffin M, Tabary O, Hong SS, Boulanger P, Paulais M, Malleret L, Belaaouaj A, Edelman A, Huerre M, Chignard M, Sallenave JM. Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 2013 January 15;187(2):170-9.
9. Haenisch MD, Ciche TA, Luckie DB. *Pseudomonas* or LPS exposure alters CFTR iodide efflux in 2WT2 epithelial cells with time and dose dependence. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 April 16;394(4):1087-92.
10. Donaldson SH, Boucher RC. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2003 November;9(6):486-91.

11. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Hoiby N, Molin S. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 2012 December;10(12):841-51.
12. Nichols DP, Konstan MW, Chmiel JF. Anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis-related lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008 December;35(3):135-53.
13. Ciofu O, Hansen CR, Hoiby N. Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2013 May;19(3):251-8.
14. Riordan JR. CFTR Function and Prospects for Therapy. *Annu Rev Biochem* 2008;77:701-26.
15. Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem* 2012 October;45(15):1132-44.
16. Van Goor F, Straley KS, Cao D, Gonzalez J, Hadida S, Hazlewood A, Joubran J, Knapp T, Makings LR, Miller M, Neuberger T, Olson E, Panchenko V, Rader J, Singh A, Stack JH, Tung R, Grootenhuis PD, Negulescu P. Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006 June;290(6):L1117-L1130.
17. Wang Y, Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Additive effect of multiple pharmacological chaperones on maturation of CFTR processing mutants. *Biochem J* 2007 September 1;406(2):257-63.
18. Rowe SM, Pyle LC, Jurkevante A, Varga K, Collawn J, Sloane PA, Woodworth B, Mazur M, Fulton J, Fan L, Li Y, Fortenberry J, Sorscher EJ, Clancy JP. DeltaF508 CFTR processing correction and activity in polarized airway and non-airway cell monolayers. *Pulm Pharmacol Ther* 2010 August;23(4):268-78.
19. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu PA. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 October 5.
20. Kim CP, Wellhauser L, Huan LJ, Ramjeesingh M, Bear CE. A Chemical Corrector Modifies the Channel Function of F508del-CFTR. *Mol Pharmacol* 2010 September;78(3):411-8.
21. Farinha CM, King-Underwood J, Sousa M, Correia AR, Henriques BJ, Roxo-Rosa M, Da Paula AC, Williams J, Hirst S, Gomes CM, Amaral MD. Revertants, Low Temperature, and Correctors Reveal the Mechanism of F508del-CFTR Rescue by VX-809 and Suggest Multiple Agents for Full Correction. *Chem Biol* 2013 July 25;20(7):943-55.

- 1  
2  
3 22. He L, Kota P, Aleksandrov AA, Cui L, Jensen T, Dokholyan NV, Riordan JR.  
4 Correctors of DeltaF508 CFTR restore global conformational maturation without  
5 thermally stabilizing the mutant protein. *FASEB J* 2013 February;27(2):536-45.  
6  
7
- 8 23. Okiyoneda T, Veit G, Dekkers JF, Bagdany M, Soya N, Xu H, Roldan A, Verkman  
9 AS, Kurth M, Simon A, Hegedus T, Beekman JM, Lukacs GL. Mechanism-based  
10 corrector combination restores DeltaF508-CFTR folding and function. *Nat Chem*  
11 *Biol* 2013 July;9(7):444-54.  
12  
13
- 14 24. Becq F, Mettey Y, Gray MA, Galiotta LJ, Dormer RL, Merten M, Metaye T,  
15 Chappe V, Marvingt-Mounir C, Zegarra-Moran O, Tarran R, Bulteau L, Derand R,  
16 Pereira MM, McPherson MA, Rogier C, Joffre M, Argent BE, Sarrouilhe D,  
17 Kammouni W, Figarella C, Verrier B, Gola M, Vierfond JM. Development of  
18 substituted Benzo[c]quinolizinium compounds as novel activators of the cystic  
19 fibrosis chloride channel. *J Biol Chem* 1999 September 24;274(39):27415-25.  
20  
21
- 22 25. Kunzelmann K, Schwiebert EM, Zeitlin PL, Kuo WL, Stanton BA, Gruenert DC.  
23 An immortalized cystic fibrosis tracheal epithelial cell line homozygous for the  
24 delta F508 CFTR mutation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993 May;8(5):522-9.  
25  
26
- 27 26. Bebok Z, Collawn JF, Wakefield J, Parker W, Li Y, Varga K, Sorscher EJ, Clancy  
28 JP. Failure of cAMP agonists to activate rescued deltaF508 CFTR in CFBE41o-  
29 airway epithelial monolayers. *J Physiol* 2005 December 1;569(Pt 2):601-15.  
30  
31
- 32 27. Trinh NT, Bardou O, Prive A, Maille E, Adam D, Lingée S, Ferraro P, Desrosiers  
33 M, Coraux C, Brochiero E. Improvement of defective cystic fibrosis airway  
34 epithelial wound repair after CFTR rescue. *Eur Respir J* 2012 December;40:1390-  
35 400.  
36  
37
- 38 28. Roussel L, Martel G, Berube J, Rousseau S. *P. aeruginosa* drives CXCL8 synthesis  
39 via redundant toll-like receptors and NADPH oxidase in CFTRF508 airway  
40 epithelial cells. *J Cyst Fibros* 2011 March;10(2):107-13.  
41  
42
- 43 29. Maille E, Trinh NT, Prive A, Bilodeau C, Bissonnette E, Grandvaux N, Brochiero  
44 E. Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by  
45 TNF-alpha after injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011  
46 December;301(6):L945-L955.  
47  
48
- 49 30. Leroy C, Prive A, Bourret JC, Berthiaume Y, Ferraro P, Brochiero E. Regulation of  
50 ENaC and CFTR expression with K<sup>+</sup> channel modulators and effect on fluid  
51 absorption across alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*  
52 2006 December;291(6):L1207-L1219.  
53  
54
- 55 31. Leroy C, Dagenais A, Berthiaume Y, Brochiero E. Molecular identity and function  
56 in transepithelial transport of K(ATP) channels in alveolar epithelial cells. *Am J*  
57 *Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004 May;286(5):L1027-L1037.  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
32. Trinh NT, Prive A, Maille E, Noel J, Brochiero E. EGF and K<sup>+</sup> channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008 November;295(5):L866-L880.
  33. Trinh NT, Prive A, Kheir L, Bourret JC, Hijazi T, Amraei MG, Noel J, Brochiero E. Involvement of KATP and KvLQT1 K<sup>+</sup> channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007 July 13;293:L870-L882.
  34. Buyck JM, Verriere V, Benmahdi R, Higgins G, Guery B, Matran R, Harvey BJ, Faure K, Urbach V. P. aeruginosa LPS stimulates calcium signaling and chloride secretion via CFTR in human bronchial epithelial cells. *J Cyst Fibros* 2013 January;12(1):60-7.
  35. Schwarzer C, Wong S, Shi J, Matthes E, Illek B, Ianowski JP, Arant RJ, Isacoff E, Vais H, Foskett JK, Maiellaro I, Hofer AM, Machen TE. Pseudomonas aeruginosa Homoserine lactone activates store-operated cAMP and cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent Cl<sup>-</sup> secretion by human airway epithelia. *J Biol Chem* 2010 November 5;285(45):34850-63.
  36. Illek B, Fu Z, Schwarzer C, Banzon T, Jalickee S, Miller SS, Machen TE. Flagellin-stimulated Cl<sup>-</sup> secretion and innate immune responses in airway epithelia: role for p38. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008 October;295(4):L531-L542.
  37. Schwarzer C, Fischer H, Kim EJ, Barber KJ, Mills AD, Kurth MJ, Gruenert DC, Suh JH, Machen TE, Illek B. Oxidative stress caused by pyocyanin impairs CFTR Cl<sup>-</sup> transport in human bronchial epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2008 December 15;45(12):1653-62.
  38. Kong F, Young L, Chen Y, Ran H, Meyers M, Joseph P, Cho YH, Hassett DJ, Lau GW. Pseudomonas aeruginosa pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization. *Cell Microbiol* 2006 July;8(7):1121-33.
  39. Maceachran DP, Ye S, Bomberger JM, Hogan DA, Swiatecka-Urban A, Stanton BA, O'toole GA. The Pseudomonas aeruginosa secreted protein PA2934 decreases apical membrane expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Infect Immun* 2007 August;75(8):3902-12.
  40. Bomberger JM, Ye S, Maceachran DP, Koeppen K, Barnaby RL, O'toole GA, Stanton BA. A Pseudomonas aeruginosa toxin that hijacks the host ubiquitin proteolytic system. *PLoS Pathog* 2011 March;7(3):e1001325.

FIGURE 1

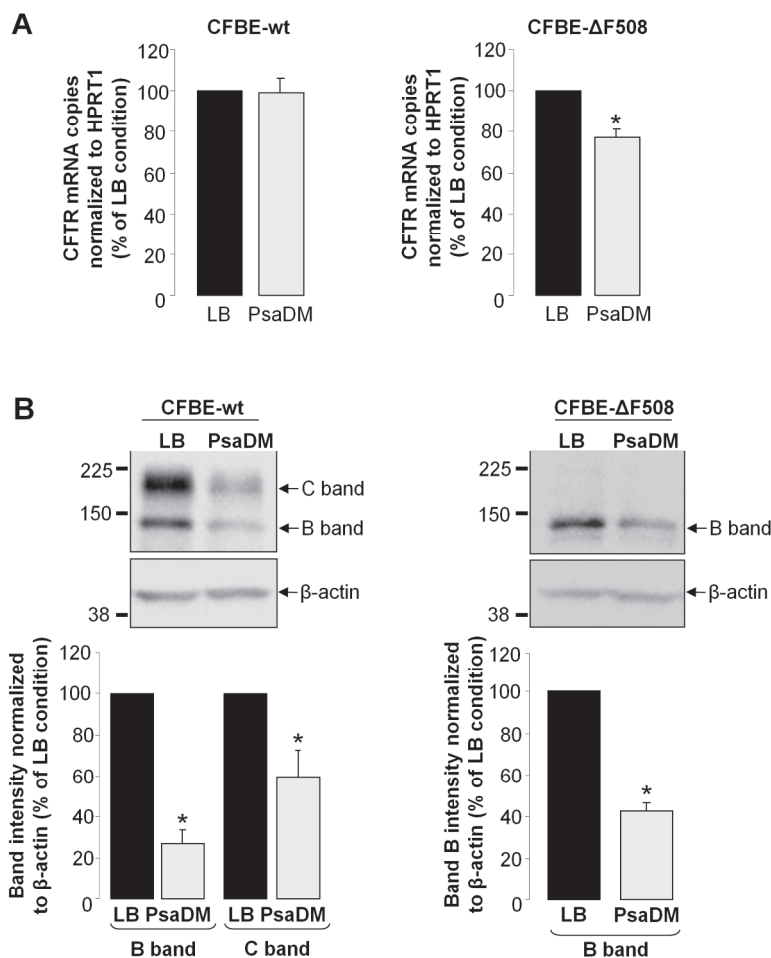


**Figure 1. Decrease of CFTR function after PsaDM treatment in CFBE-wt airway cell monolayers.**

CFBE-wt cells were cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated for 24 h with either 10% of LB or *P. aeruginosa* filtrate (Psa diffusible material, PsaDM) before short-circuit current measurements ( $I_{\text{short-circuit}}$ ) in an Ussing chamber. Intact cell monolayers were bathed in a symmetrical physiological medium containing 10  $\mu\text{M}$  amiloride, and then sequentially exposed to a combination of 10  $\mu\text{M}$  forskolin and 100  $\mu\text{M}$  IBMX, followed by 30  $\mu\text{M}$  genistein and, finally, 20  $\mu\text{M}$  CFTR<sub>inh-172</sub> (CFFT Inc.). Representative  $I_{\text{short-circuit}}$  traces are reported for each condition (LB and PsaDM) in (A) while quantification of the mean  $\Delta I_{\text{Fsk+IBMX+Genistein}}$  and  $\Delta I_{\text{CFTR}_{\text{inh-172}}}$  short-circuit currents (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) after LB and PsaDM exposure is reported in (B).  $n=5$ ,  $p<0.02$ .

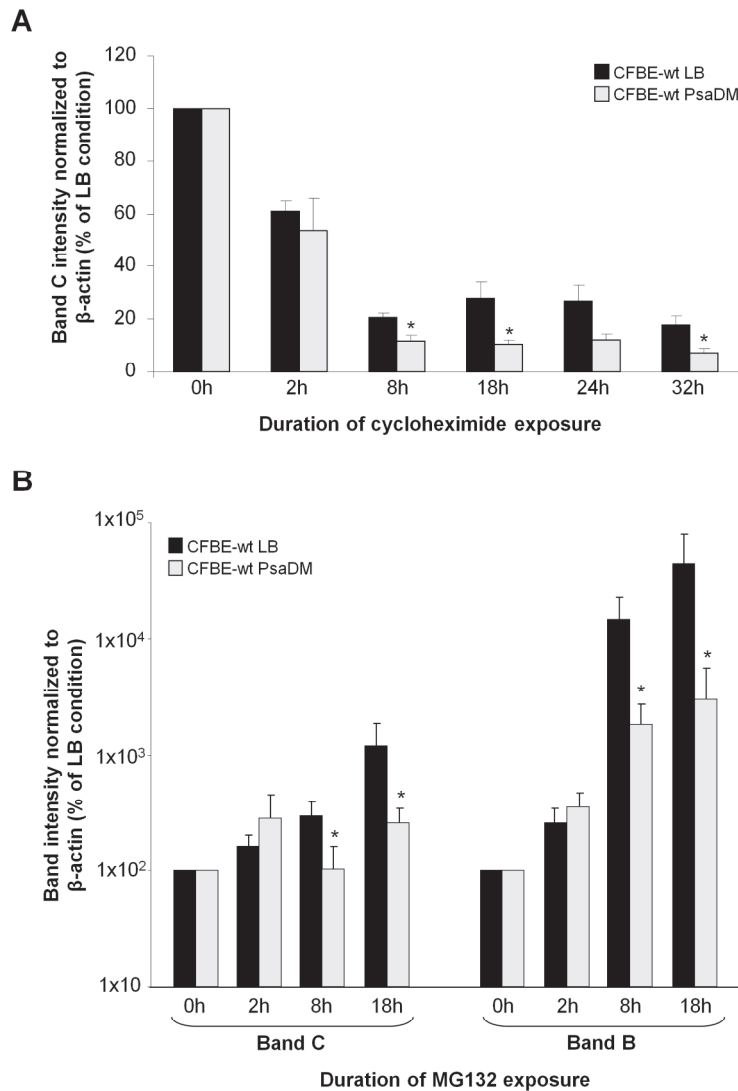
254x338mm (300 x 300 DPI)

FIGURE 2



**Figure 2. Decrease of CFTR mRNA and protein expression after PsaDM treatment.** CFBE-wt and CFBE-ΔF508 cells were cultured for 8 days (until confluence was reached), then treated with either 10% of LB or PsaDM for 24 h. Levels of CFTR mRNA (**A**, CFBE-wt, n=8, NS and CFBE-ΔF508, n=5,  $p < 0.006$ ) and protein expression (**B**, n=5,  $p < 0.04$ ) were quantified and reported as % of the LB control. Representative immunoblots are also presented in **B**.  
254x338mm (300 x 300 DPI)

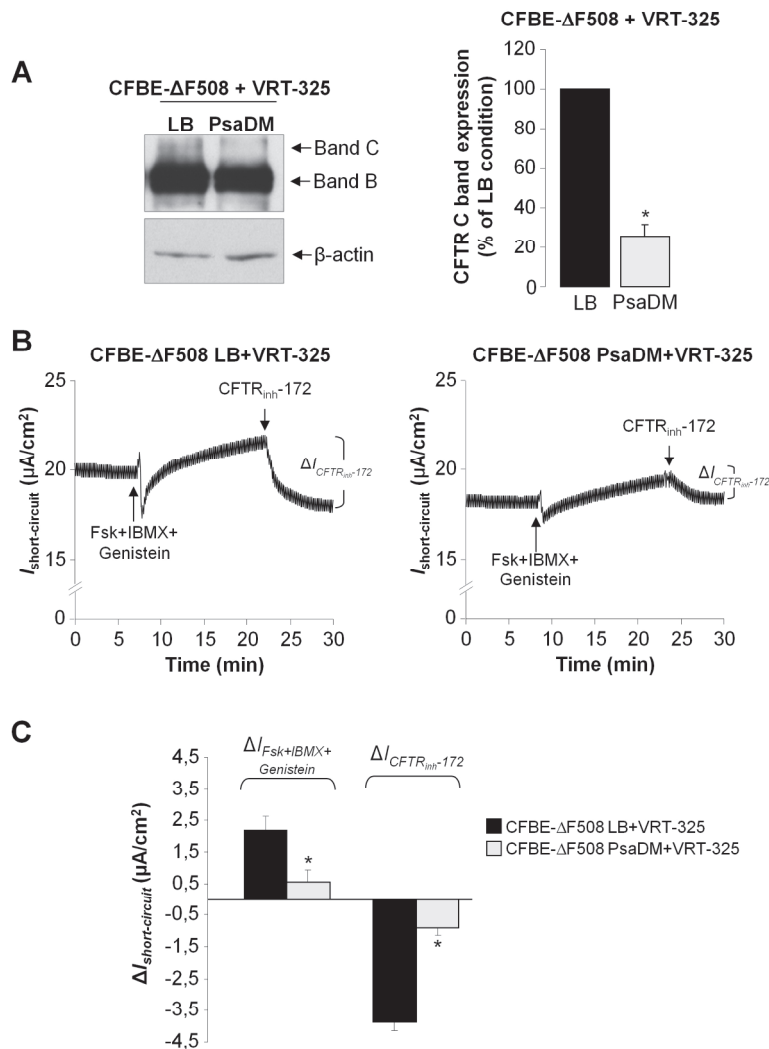
FIGURE 3



**Figure 3. Impact of PsADM treatment on degradation and synthesis of CFTR protein in CFBE-wt airway cell monolayers.** **A.** CFBE-wt cells were cultured until confluence was reached (8 days), then treated with 100  $\mu$ g/ml of cycloheximide (for 2, 8, 18, 24 and 32h, **A**,  $n=6$ ,  $p<0.05$ ) or with 5  $\mu$ M of MG132 (for 2, 8 and 18 h, **B**,  $n=11$ ,  $p<0.04$ ), in the presence of 10% LB or PsADM. The whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE separation and analysed by immunoblotting with anti- $\beta$ -actin (used as loading control) and anti-CFTR antibodies to evaluate the kinetics of CFTR protein degradation in the presence of cycloheximide (**A**) and the accumulation of newly synthesized CFTR protein in the presence of the proteasomal inhibitor MG132 (**B**).  
254x338mm (300 x 300 DPI)



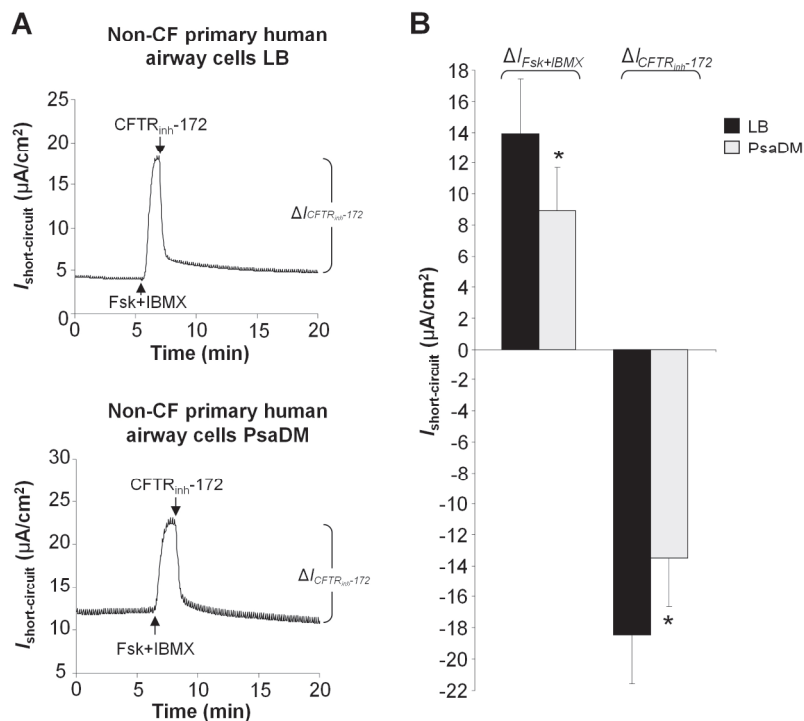
FIGURE 4



**Figure 4. Impairment of  $\Delta$ F508-CFTR functional rescue after PsaDM treatment.** **A.** CFTR band C protein expression in CFBE- $\Delta$ F508 cells treated with 5  $\mu\text{M}$  VRT-325 for 24 h in the presence of 10% LB or PsaDM was quantified and reported as % of the LB control ( $n=5$ ,  $p<0.0005$ ). A representative immunoblot is also presented in the left panel. Short-circuit currents ( $I_{\text{short-circuit}}$ ) were measured in an Ussing chamber through CFBE- $\Delta$ F508 cells, cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated for 24 h with VRT-325 in combination with either 10% LB or PsaDM. After mounting in an Ussing chamber, cells were bathed with an asymmetrical physiological solution (low  $\text{Cl}^-$  concentration solution at the apical side and high  $\text{Cl}^-$  concentration at the basolateral side) and the basolateral side was permeabilized with 7.5  $\mu\text{M}$  amphotericin B. Upon  $I_{\text{sc}}$  stabilization, cells were treated with a mix of forskolin, IBMX and genistein, and then with 20  $\mu\text{M}$  CFTR<sub>inh</sub>-172. Representative  $I_{\text{short-circuit}}$  traces are reported for each condition in **(B)** while quantifications of the mean  $\Delta I_{\text{Fsk+IBMX+Genistein}}$  and  $\Delta I_{\text{CFTR}_{inh}\text{-172}}$  short-circuit currents (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) after LB+VRT-325 and PsaDM+VRT-325 exposure are reported in **(C)**,  $n=12$ ,  $p<0.0001$ .

254x338mm (300 x 300 DPI)

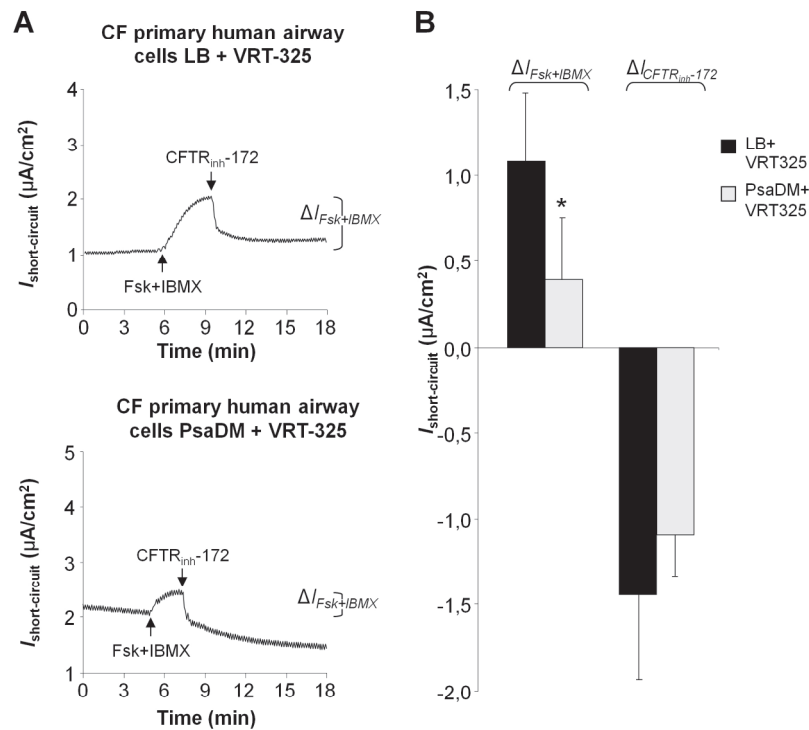
FIGURE 5



**Figure 5. Inhibition of wt-CFTR function after PsADM treatment in non-CF human primary airway cell monolayers.** Short-circuit current measurements ( $I_{\text{short-circuit}}$ ) in an Ussing chamber were performed on non-CF human primary airway cell monolayers, cultured on permeant filters at the air-liquid interface, treated for 24 h with either 5% LB or PsADM. After mounting in an Ussing chamber, cells were bathed with an asymmetrical physiological solution (low  $\text{Cl}^-$  physiological solution at the apical side and high  $\text{Cl}^-$  solution at the basolateral side), containing 10  $\mu\text{M}$  amiloride. Upon  $I_{\text{sc}}$  stabilization, cells were treated with a combination of forskolin and IBMX, followed by 20  $\mu\text{M}$  CFTR<sub>inh-172</sub>. Representative  $I_{\text{short-circuit}}$  traces are reported for each condition (**A**, LB (upper panel) and PsADM (lower panel)) while quantifications of the mean  $\Delta I_{\text{Fsk+IBMX}}$  and  $\Delta I_{\text{CFTR}_{\text{inh-172}}}$  short-circuit currents (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) after LB+VRT-325 and PsADM+VRT-325 exposure are reported in (**B**,  $n=7$ ,  $p<0.05$ ).

254x338mm (300 x 300 DPI)

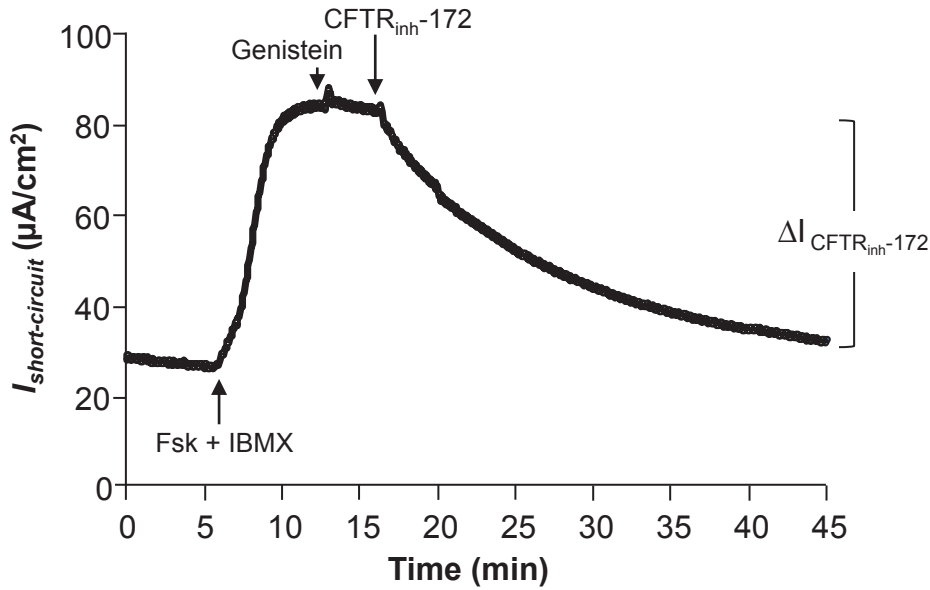
FIGURE 6



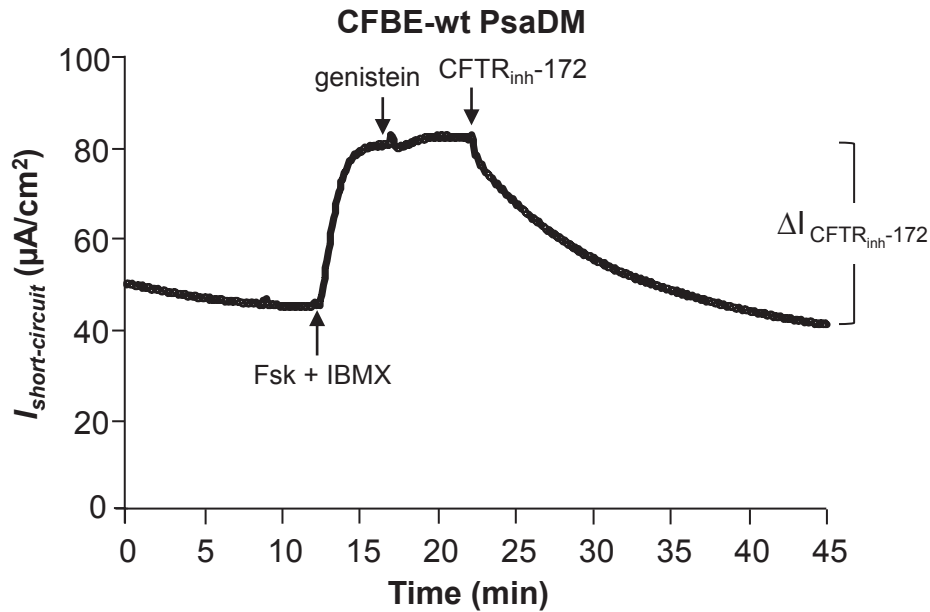
**Figure 6. Inhibition of  $\Delta\text{F508}$ -CFTR functional rescue after PsADM treatment in CF human primary airway cell monolayers.** Short-circuit current measurements ( $I_{\text{short-circuit}}$ ) in an Ussing chamber were performed on CF human primary airway cell monolayers, cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated for 24 h with 10  $\mu\text{M}$  VRT-325 in combination with either 5% LB or PsADM. After mounting in an Ussing chamber, filters were bathed with an asymmetrical physiological solution (low  $\text{Cl}^-$  physiological solution at the apical side and high  $\text{Cl}^-$  at the basolateral side), containing 10  $\mu\text{M}$  amiloride. Upon Isc stabilization, the filters were treated with a combination of forskolin and IBMX, followed by 20  $\mu\text{M}$   $\text{CFTR}_{\text{Inh}}^{-172}$ . Representative  $I_{\text{short-circuit}}$  traces are reported for each condition (**A**, LB (upper panel) and PsADM (lower panel) while quantifications of the mean  $\Delta I_{\text{Fsk+IBMX}}$  and  $\Delta I_{\text{CFTR}_{\text{Inh}}^{-172}}$  short-circuit currents (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) after LB+VRT-325 and PsADM+VRT-325 exposure is reported in (**B**).  $n=6$ ,  $p<0.03$ .

254x338mm (300 x 300 DPI)

**A**



**B**



**Supplementary figure S1. Decrease of CFTR function after PsaDM treatment in CFBE-wt airway cell monolayers.** CFBE-wt cells were cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated for 24 h with either 10% of LB or *P. aeruginosa* filtrate (Psa diffusible material, PsaDM) before short-circuit current measurements ( $I_{short-circuit}$ ) in an Ussing chamber. Intact cell monolayers were bathed with an asymmetrical physiological solution (low Cl<sup>-</sup> concentration solution at the apical side and high Cl<sup>-</sup> concentration at the basolateral side), containing 10  $\mu M$  amiloride, and then sequentially exposed to a combination of 10  $\mu M$  forskolin, 100  $\mu M$  IBMX and 30  $\mu M$  genistein, followed by 20  $\mu M$  CFTR<sub>inh</sub>-172 (CFFT Inc). Representative  $I_{short-circuit}$  traces are reported for each condition (LB, panel **A** and PsaDM, panel **B**).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58

1  
2  
3 Trinh et al. Deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* on CFTR function in airway  
4 epithelial cells.  
5  
6

## 7 8 **Supplementary methods**

### 9 10 *Cell Culture*

#### 11 12 *CFBE-ΔF508 and CFBE-wt cell lines*

13  
14  
15  
16 CFBE-ΔF508 and CFBE-wt cell lines were grown in EMEM (Wisent, St-Bruno, QC,  
17 Canada) supplemented with 10 % FBS (Life Technologies, Burlington, ON, Canada), 2  
18 mM L-glutamine (Life Technologies) and 100 U/ml of penicillin-streptomycin on 12-  
19 well cell culture plates (Corning, Saint-Lambert, QC, Canada) and permeant filters  
20 (Corning) coated with a LHC basal medium (Life Technologies) supplemented with 1  
21 mg/ml BSA (Life Technologies), 0.05 mg/ml bovine collagen I (Life Technologies) and 1  
22 mg/ml human fibronectin (VWR, Mont-Royal, QC, Canada) [1].  
23  
24  
25  
26  
27

#### 28 29 *Human primary cells*

30  
31  
32 After recovery, tissues were rinsed several times and then incubated for 18 h at 4°C with  
33 MEM medium (Life Technologies) supplemented with 7.5 % NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich),  
34 2 mM L-glutamine (Life Technologies), 10 mM HEPES (Fisher Scientific), 0.05 mg/ml  
35 gentamycin (Sandoz, Boucherville, QC, Canada), 50 U/ml penicillin-streptomycin, 0.25  
36 >g/ml Fungizone (Life Technologies), 0.1 % protease (Sigma-Aldrich) and 10 >g/ml  
37 DNase (Sigma-Aldrich). After the overnight incubation in the presence of protease-  
38 DNase, enzyme activity was neutralized with FBS, airway epithelial cells were gently  
39 scraped off the remaining tissue and red blood cells were removed by treatment with  
40 ACK lysis buffer (0.1 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 >M KHCO<sub>3</sub>, 10 nM EDTA). After counting, the  
41 cells were seeded into flasks coated with Purecol (Cedarlane Laboratory, Burlington,  
42 Ontario, Canada). Primary human airway epithelial cells were grown to confluence on  
43 Purecol-coated supports in CnT-17 medium (CellnTec Advanced Cell Systems) [1]. For  
44 the electrophysiology measurements, primary human airway cells were seeded on  
45 permeant filters coated with Collagen VI (Sigma-Aldrich) and cultured with CnT-17  
46 medium supplemented with 20% FBS for 1 week. The cell monolayers were then  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 cultured in differentiation medium (1:1 volume of BEGM medium (Clonetics,  
4 Walkersville, MD, USA) and DMEM medium (Gibco, Burlington, ON) supplemented  
5 with 1.5 >g/mL BSA and  $10^{-7}$  M retinoic acid) for 4-8 weeks.  
6  
7  
8

### 9 10 *Immunoblotting*

11  
12 CFBE cells were scraped in ice-cold PBS, the cell suspension was recovered and the cell  
13 pellet was then solubilised in RIPA lysis buffer [150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0,  
14 1% Triton X-100, 0.08 % Deoxycholic acid, 0.1 % SDS, and protease inhibitor cocktail  
15 (Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada)]. Cell lysates (4 >g of protein for CFBE-wt and  
16 10-15 >g for CFBE- $\Delta$ F508) in 2X sample buffer [100 mM Tris-HCl pH 6.8, 200 mM  
17 DTT, 4 % SDS, 0.2 % bromophenol blue and 20 % glycerol] were separated by SDS-  
18 PAGE (7.5 %) and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were first  
19 blocked for 18 h at 4°C; then the upper section of the membrane was incubated with the  
20 polyclonal anti-CFTR 596 antibody (CFFT). The bottom section was incubated with  
21 purified mouse anti- $\beta$ -actin monoclonal antibody (Cedarlane Laboratory) to ensure  
22 equivalent loading and for signal normalization. After washing and blocking, the  
23 membranes were incubated with goat anti-mouse hrp conjugated antibody (Millipore,  
24 Temecula, CA, USA), before chemiluminescent detection (Amersham<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup> Prime  
25 Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare Life Sciences, Baie d'Urfé, QC,  
26 Canada) and quantification of the bands using Image Lab<sup>TM</sup> software (Bio-Rad). The  
27 anti-CFTR antibody recognized a 180 kDa (mature band C) and a 160 kDa (immature  
28 band B) protein.  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

### 43 *Electrophysiology*

44  
45 CFBE and primary airway epithelial cell monolayers were mounted in a heated (37°C)  
46 Ussing chamber and bathed with a physiological solution (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10  
47 mM TES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose, pH 7.4). The rescue of CFTR Cl<sup>-</sup>  
48 currents through apical membranes of CF cell monolayers by VRT-325 was evaluated  
49 after establishment of a Cl<sup>-</sup> gradient (low Cl<sup>-</sup> physiological solution at the apical side and  
50 high Cl<sup>-</sup> at the basolateral side) and permeabilization of the basolateral side with 7.5 >M  
51 amphotericin B (Sigma-Aldrich). Transepithelial potential difference was clamped to  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 zero by an external voltage clamp amplifier (VCCMC2, Physiological Instruments, San  
4 Diego, CA, USA) with KCl agar-calomel half-cells and Ag-AgCl electrodes, and the  
5 resulting *I<sub>sc</sub>* was recorded continuously on a computer with the PowerLab system  
6 (ADInstruments, Toronto, ON, Canada). Membrane resistance was verified with 1 mV  
7 pulses every minute.  
8  
9

### 10 11 12 ***CFTR mRNA expression***

13  
14  
15 Total RNA from CFBE cells was purified with TRIzol reagent according to the  
16 manufacturer's instructions (Life Technologies)[1]. For cDNA synthesis, 1 µl of random  
17 primer (200 ng/µl, Life Technologies) and 1 µl dNTPs (10 mM, Life Technologies) were  
18 added to 1 µg of total RNA in 10 µl H<sub>2</sub>O. After heating for 5 min at 65°C and a 3-min  
19 incubation on ice, 4 µl of 5X First Strand Buffer (Life Technologies), 2 µl of 0.1 M DTT  
20 (Life Technologies), 1 µl of RNase-out (Life Technologies) and 1 µl of MMLV reverse  
21 transcriptase (Life technologies) were added. The reaction was incubated for 10 min at  
22 20°C for annealing of the primers, then for 50 min at 37°C for cDNA synthesis. The  
23 reaction was stopped by a 15-min incubation at 70°C. For the qPCR amplification, 1.5 ng  
24 of cDNA were amplified with 225 nM of forward and reverse primers with  
25 SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) in a final volume of  
26 15 µl. qPCRs for CFTR (5'-gccctcagggggccaaatgac-3' and 3'-tccaagaggcccaccctctg-5',  
27 Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IO, USA) were amplified in a Rotor-Gene  
28 Q5 Plex (Qiagen, Toronto, ON). For normalization of sample to sample variations, we  
29 used HPRT1 (5'-gcagcctggcgtgatta-3' and 3'-tctcgagcaagacgttcagctctgt-5', Integrated  
30 DNA Technologies Inc., Coralville, USA). Standard cDNA was also run in parallel to the  
31 samples tested in duplicate, to normalize the signal amplification between runs. For  
32 quantitative analysis, the fluorescence signal of dsDNA with SYBR Green was converted  
33 to a gene copy number calculated from the dilution curve of the standard reaction.  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

### 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 References

1. Trinh NT, Bardou O, Prive A, Maille E, Adam D, Lingée S, Ferraro P, Desrosiers M, Coraux C, Brochiero E. Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. *Eur Respir J* 2012 December;40:1390-400.

## **Chapitre 4 – Discussion et perspectives**

Mes travaux ont permis de montrer pour la première fois que l'épithélium des voies aériennes FK présentait un défaut de réparation de base. De plus, nous avons mis en évidence que le canal CFTR participait non seulement aux processus de réparation, tels que la migration et la prolifération cellulaire, mais serait également responsable, en partie, du délai de réparation observé dans les monocouches de cellules épithéliales humaines des voies aériennes FK. D'autre part, nos résultats ont révélé une fonction nouvelle et insoupçonnée des correcteurs du CFTR. En effet, nous avons montré que la correction du canal CFTR par le correcteur VRT-325 améliorait la capacité de réparation des monocouches de cellules épithéliales des voies aériennes FK. Cependant, nous avons observé une altération de l'expression et de la fonction du canal CFTR en présence de filtrat bactérien de *P. aeruginosa*. Nos résultats ont aussi montré que les exoproduits bactériens contenus dans ce filtrat affectaient la maturation et la correction de la fonction du canal CFTR.

### **4.1) Limitations des modèles cellulaires et expérimentaux**

#### **4.1.1) Limitations des modèles cellulaires FK et non-FK**

Durant mes travaux, j'ai utilisé des lignées cellulaires FK et non-FK pour certaines de mes expériences parce que nous ne disposons pas d'une grande disponibilité de cellules humaines primaires FK. Nous sommes conscients que la réponse cellulaire lors d'expériences *in vitro* peut différer de celle des cellules humaines primaires ainsi que de celle dans un modèle *in vivo*.

Aucune des lignées cellulaires utilisées ne constituait un modèle d'étude idéal, mais les résultats obtenus par l'utilisation de chacune de ces différentes lignées ont apporté des informations complémentaires en ce qui concerne le rôle de CFTR dans les processus de réparation épithéliale. En effet, nos expériences nous ont permis de démontrer pour la première fois que l'absence et/ou la dysfonction du CFTR était en partie responsable du défaut de réparation de l'épithélium FK. D'abord, l'utilisation des cellules NuLi-1 et CuFi-1, qui sont des cellules transformées, mais avec une expression de CFTR dite «normale», nous ont permis d'observer pour la première fois le retard de réparation. Par contre, ces cellules possèdent des fonds génétiques différents puisqu'elles proviennent de deux patients distincts d'âge et de sexe différents. Ainsi, pour contrer ce problème, nous avons choisi par la suite de travailler avec les



paires de cellules IB3 et S9 ainsi que CFBE- $\Delta$ F508 et CFBE-wt. Les cellules S9 sont à la base des cellules bronchiques FK IB3 dans lesquelles le CFTR-wt a été transduit, alors que les cellules CFBE sont des cellules bronchiques FK CFBE41o- qui surexpriment soit du CFTR- $\Delta$ F508 ou du CFTR-wt. Nous sommes conscients que ces cellules sont aussi transformées, mais elles ont l'avantage de posséder, dans la même paire de cellules, le même fond génétique. Ceci nous a donc permis de comparer ces lignées cellulaires et de démontrer que la correction du CFTR était bel et bien responsable l'amélioration de la réparation. Nous avons voulu ensuite confirmer nos résultats dans des cellules humaines primaires des voies aériennes. C'est ce qui nous a poussés à privilégier l'utilisation de cellules isolées à partir de bronches et de polypes nasaux de patients FK et non-FK. Malgré le fait que les cellules humaines primaires ne constitue pas un modèle *in vivo*, elles ont toutefois l'avantage de posséder des caractéristiques et de présenter des réponses cellulaires se rapprochant plus de la réalité.

Dans notre étude, nous avons étudié les mécanismes de réparation uniquement sur un type cellulaire, soit les cellules épithéliales. Au niveau des voies aériennes, plusieurs autres types cellulaires, qui ne sont pas représentés dans notre modèle, peuvent intervenir dans les processus de réépithélisation, tels que les cellules basales, les niches de cellules progénitrices, les cellules inflammatoires, les cellules endothéliales ainsi que les fibroblastes. Ces cellules peuvent participer soit à la dégradation des tissus partiellement dénaturés, à la production d'une matrice provisoire ou même à la sécrétion de différents facteurs cellulaires et moléculaire qui favorisent la migration et la prolifération cellulaire dans le but de rétablir la barrière épithéliale (122). Toutefois, il est important de noter que nos modèles d'étude a permis de démontrer et à soulever l'importance des cellules épithéliales dans les processus de réparation. En effet, dans notre étude, nous avons pu observer que ces cellules arrivent, à elles seules, à migrer et proliférer afin de recouvrir la région lésée.

Il est vrai qu'il existe maintenant des modèles animaux FK, tels que le cochon et le furet (278-280), qui peuvent développer une pathologie pulmonaire semblable aux humains. Ces modèles nous permettraient d'étudier la régénération épithéliale FK dans son ensemble, en présence d'inflammation, des cellules immunes et sur un vrai épithélium des voies aériennes. Toutefois, ce sont de gros animaux et le coût d'entretien ainsi que leur temps de reproduction peuvent devenir des paramètres contraignants et limitants dans le domaine de la

recherche. De plus, à cause des différences inter-espèces, nous avons jugés plus pertinent d'utiliser des cellules humaines dans le cadre de notre étude.

#### **4.1.2) Limitations du modèle de plaie mécanique**

Nous avons choisi le modèle de plaies mécaniques pour sa simplicité et pour sa reproductibilité pour tester nos hypothèses de travail. Ce modèle était idéal pour le but de l'étude, qui était de démontrer le rôle du CFTR dans les processus de migration et de prolifération durant la réparation. En effet, lors des expériences de vidéo-microscopie pour suivre la refermeture d'une plaie mécanique sur une monocouche cellulaire afin de mesurer les vitesses de réparation et de migration cellulaire, nous avons pu clairement voir le mouvement des cellules en bord de plaie, la formation de lamellipode et même la division cellulaire. Malgré les temps relativement courts de nos expériences, nous avons pu observer des processus dynamiques et suivre les phénomènes précoces de la réparation épithéliale, telle que la migration et la prolifération cellulaire. De plus, notre modèle de plaie mécanique, à l'inverse de l'étude sur les tissus d'un poumon au grand complet, permet une étude plus fine ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires activés et impliqués durant les processus de réparation.

Il demeure évident que les mécanismes de réparation *in vivo* sont beaucoup plus longs et complexes. En effet, certains paramètres de la régénération épithéliale *in vivo* ne sont pas considérés dans notre modèle *in vitro*. Comme décrit dans la section 1.3.4.1 (voir **Figure 10**), une étape importante durant la régénération épithéliale est la différenciation cellulaire qui est essentielle au rétablissement d'un épithélium pseudostratifié fonctionnel. Pour l'étude de cette étape, il existe la technique de xéno greffe du D<sup>re</sup> Coraux de France, que nous sommes allés apprendre et qui permet de suivre la régénération d'un épithélium pseudostratifié. En effet, dans cette technique, des cellules humaines primaires de voies aériennes non-FK et/ou FK sont inoculées dans des trachées de rat dénudées de leur épithélium. Ces trachées sont alors greffées sur le dos de souris *nudes* et la régénération épithéliale se déroule sur 30 jours (116). Les greffons sont alors prélevés et cryopréservés pour ensuite pouvoir étudier l'histologie de l'épithélium régénéré dans la trachée. Les avantages de cette technique sont la possibilité d'étudier la régénération épithéliale de cellules humaines primaires, de récupérer les produits sécrétés durant la régénération (semblables à des BAL) ainsi que d'appliquer différentes

molécules pour explorer leur rôle dans la régénération épithéliale, telles que les correcteurs, les activateurs des canaux  $K^+$ , les exoproduits bactériens et les médiateurs inflammatoires. Toutefois, due la durée des expériences, nous ne pouvons pas étudier l'impact de la présence de bactéries vivantes sur le processus de réépithélisation. De plus, à l'inverse de notre modèle de plaies mécaniques, nous ne pouvons pas étudier et suivre les phénomènes précoces de la réparation, tels que la formation des lamellipodes durant la migration cellulaire. Cependant, le défaut majeur de cette technique est que la régénération observée ne fait pas suite à des lésions épithéliales contrairement à notre modèle de plaie.

Une autre technique, développée en ce moment au laboratoire, est d'étudier la réparation de cellules humaines primaires des voies aériennes non-FK et FK différenciées sur filtres. Dans ce cas-ci, les lésions sont effectuées par un jet d'air comprimé. Encore une fois, ce modèle de plaie *in vitro* ne permet pas de suivre la différenciation d'un vrai épithélium pseudostratifié. Cependant, de façon intéressante, notre technique de culture cellulaire nous permet d'obtenir une certaine différenciation cellulaire et d'observer la présence de cellules ciliées et de cellules sécrétrices. Nous pensons qu'il n'existe pas à ce jour un modèle idéal pour étudier la régénération épithéliale. Toutefois, nous croyons que la combinaison des informations obtenues par l'utilisation de chaque technique peut nous permettre de dresser un meilleur portrait des différents phénomènes et paramètres impliqués dans la régénération épithéliale.

#### **4.1.3) Limitations du modèle d'infection**

Pour l'étude de l'impact de l'infection sur les mécanismes de réparation, nous avons utilisé un filtrat bactérien de *P. aeruginosa*. Nous avons donc limité notre étude à une seule bactérie, malgré le fait que nous savons que les voies aériennes FK sont souvent colonisées par différents pathogènes (67-69). Il demeure que *P. aeruginosa* est la bactérie la plus fréquemment retrouvée dans les voies aériennes des patients FK. Notre étude a tout de même permis d'isoler et de mieux comprendre son impact sur la fonction de CFTR. Cependant, l'étude de différentes bactéries pourrait permettre également d'obtenir des informations complémentaires. Nous pourrions d'abord tester l'impact individuel de chaque type de bactérie sur les mécanismes de réparation épithéliale et nous pourrions par la suite évaluer leur

effet combiné afin de tenter de mimer l'infection présente dans les voies aériennes des patients FK.

De plus, la bactérie choisie pour mes travaux était une souche clinique mucoïde. Ainsi, le filtrat bactérien utilisé risque de ne pas représenter la réalité puisqu'il se pourrait que cette souche ait évolué différemment chez ce patient. En effet, comme mentionné dans la **section 1.3.2.1**, le stress environnemental des voies aériennes FK peut entraîner une hypermutabilité chez les bactéries présentes. En effet, la conversion du phénotype non-mucoïde à celle mucoïde serait causée, entre autre, par la mutation du gène *mucA* (68). Pour faire suite à notre étude, nous pourrions également comparer l'impact de différentes souches mucoïde et non-mucoïde de *P. aeruginosa* pour mieux comprendre les mécanismes par lesquels la bactérie affecte les processus de réparation épithéliale et la fonction/expression de CFTR. L'évaluation de la différence de la réponse des monocouches cellulaires suite à l'exposition à des biofilms de bactéries ou des bactéries planctoniques pourrait également amener de nouvelles notions concernant leur mode d'action dépendamment de leur forme.

Enfin, en raison des contraintes expérimentales, nous n'avons pas pu étudier l'impact direct des bactéries sur nos cellules des voies aériennes FK et non-FK. Il est vrai que l'équipe du D<sup>r</sup> Stanton (250) avait réussi à appliquer des bactéries vivantes sur leur culture cellulaire, mais l'exposition était relativement de courte durée. Nous sommes conscients que la présence de bactéries aurait pu influencer nos résultats et que certains paramètres sont probablement négligés. C'est pourquoi une alternative possible serait d'effectuer des co-cultures de cellules humaines primaires des voies aériennes avec des bactéries. Il deviendrait ainsi possible d'explorer l'effet des bactéries et de leurs exoproduits dans le même «environnement» et ainsi mimer une infection au niveau des voies aériennes. Toutefois, il est important de souligner que l'utilisation du filtrat bactérien nous a permis de démontrer, dans le cadre de mon étude, que ce n'est pas uniquement la présence des bactéries, mais c'est plutôt ce qu'elles peuvent sécréter qui peut avoir un effet délétère sur le CFTR, la correction du CFTR et la réparation épithéliale. Ceci amène une toute autre perspective de l'impact de l'infection bactérienne sur la physiologie de l'épithélium des voies aériennes FK.

## **4.2) L'épithélium fibrose kystique**

Il est bien établi que l'absence et/ou la dysfonction du canal CFTR au niveau de l'épithélium des voies aériennes entraînerait une cascade d'évènements menant à la colonisation bactérienne chronique et à une réponse inflammatoire excessive (236). De plus, plusieurs études ont suggéré que l'épithélium FK serait plus susceptible et vulnérable aux infections et à l'inflammation (17;28;87;88). Ainsi, l'environnement cellulaire dans les voies aériennes FK deviendrait propice au développement de lésions épithéliales et affecterait le déroulement normal des processus de régénération tissulaire (101;105;110;127). Cette destruction graduelle de l'épithélium FK combinée aux cycles d'infections et d'inflammation contribueraient à la progression de la pathologie, menant au déclin de la fonction pulmonaire et à la défaillance respiratoire (10;88;101;105;112;116;120).

### **4.2.1) Analyse ultrastructurale de l'épithélium fibrose kystique**

Les études, quoique peu nombreuses, décrivant les modifications ultrastructurales observées dans les poumons FK remontent à plusieurs années (10;101;116). Ainsi, pour prouver l'importance de notre étude qui porte sur les processus de réparation épithéliale, nous avons d'abord voulu confirmer la présence et l'étendue des dommages tissulaires dans le poumon FK. Nos analyses histologiques ont révélé, en accord avec la littérature (10;101), de l'hyperplasie de cellules basales et caliciformes, de l'hyperplasie et l'hypertrophie des glandes ainsi que de la métaplasie squameuse. Cependant, étant donné que notre analyse portait seulement sur des sections bronchiques lobaires et segmentales, nous n'avons pas recueilli de données concernant les modifications structurales au niveau de l'épithélium des voies nasales, bronchiolaire et alvéolaire, comme rapporté précédemment par d'autres équipes (10;237;238). Mise à part l'hyperplasie et l'hypertrophie des glandes qui étaient présentes dans tous les spécimens, l'atteinte épithéliale semblait varier d'un patient et d'une zone à l'autre. En effet, il est intéressant de noter que, même à un stade semblable de la maladie (i.e. des patients nécessitant une transplantation), la sévérité des lésions et l'étendue du remodelage épithélial étaient différentes d'un patient à un autre. Toutefois, dans tous les spécimens, nous avons retrouvé des sections montrant une dénudation complète de l'épithélium exposant la lame basale (104). Nous avons aussi observé des zones intactes de l'épithélium pseudostratifié avec des cellules basales, ciliées et caliciformes d'apparence normale. Nous ne nous attendions pas,

cependant, à pouvoir observer de telles zones, surtout lorsque celles-ci étaient adjacentes à des zones entièrement lésées et/ou remodelées. Ceci démontre donc une hétérogénéité histologique et structurale assez marquée au niveau de l'épithélium FK. Nous ignorons toutefois quelle serait l'étendue de l'atteinte épithéliale chez les patients à un stade plus précoce de la maladie. Il apparaît alors évident que le développement de stratégies pour favoriser la régénération de l'épithélium FK, dès les premières insultes, est crucial.

#### **4.2.2) Le défaut de réparation de l'épithélium fibrose kystique**

Lors de nos analyses histologiques, nous avons pu observer, chez quelques patients, des régions montrant des signes de réparation au niveau de l'épithélium des voies aériennes, ce qui avait déjà été décrit par le passé (102;103). Comme Shute *et al.* l'ont expliqué, malgré les niveaux élevés de facteurs de croissance dans les BAL de patients FK, l'épithélium des voies aériennes semblerait incapable de rétablir l'intégrité de la barrière épithéliale et de prévenir les processus de remodelage (104). Nous nous sommes alors demandé si cette incapacité de l'épithélium FK à se régénérer était due à la composante infectieuse, inflammatoire ou à un défaut intrinsèque de l'épithélium. En fait, nous avons eu notre première indication de l'existence possible de ce défaut de base de réparation durant une étude effectuée au cours de ma maîtrise. En nous basant sur l'article de Shute *et al.*(104), nous avons alors suggéré que l'épithélium des voies aériennes FK pouvait moins bien répondre aux facteurs de croissance. Nous avons effectivement démontré que la voie EGF/EGFR était altérée dans les cellules épithéliales humaines bronchiques CuFi-1 (149). De plus, nous avons observé, pour la première fois, un retard de réparation des monocouches de cellules humaines bronchiques FK CuFi-1 (comparativement aux cellules NuLi-1). Ce retard était accompagné d'une expression ainsi que d'une fonction réduite des canaux K<sup>+</sup> dans les cellules CuFi-1. Tels que détaillés dans les prochaines sections, les résultats obtenus au cours de mon doctorat, ainsi que plusieurs études récentes ont effectivement confirmé un défaut intrinsèque de réparation/régénération de l'épithélium FK (116;127;167;172;239).

##### **4.2.2.1) Le défaut de base de l'épithélium fibrose kystique et le rôle du CFTR**

À la lumière des résultats obtenus durant ma maîtrise à partir de lignées cellulaires (NuLi-1 et CuFi-1), nous avons proposé que l'épithélium des voies aériennes FK pouvait

posséder un défaut de réparation. Lors de mon doctorat, nous avons alors comparé les vitesses de réparation entre des monocouches de différents modèles de cellules épithéliales FK et saines. De façon intéressante, nous avons observé un délai significatif de la réparation dans toutes les cellules FK par rapport aux cellules saines correspondantes et ce, que ce soit dans des cellules en lignée ou dans des cellules humaines primaires provenant des patients. Nos résultats ont également révélé que ce retard de réparation pourrait être dépendant du dysfonctionnement du canal CFTR. En effet, nous avons démontré que l'extinction de l'expression et/ou l'inhibition de l'activité du CFTR dans des cellules primaires de voies aériennes collectées chez des individus non-FK mimait le retard de réparation observé dans l'épithélium FK. De la même manière, Schiller *et al.* ont démontré que la transfection de shRNA de CFTR dans des cellules Calu-3 entraînait aussi un délai dans le processus de refermeture de plaies (171), confirmant ainsi nos résultats.

Dans notre étude, nous avons démontré que le CFTR modulait le processus migratoire des cellules humaines primaires des voies aériennes. De façon intéressante, le CFTR s'est vu attribuer le même rôle, mais cette fois-ci dans des cellules trophoblastiques BeWo (174), consolidant ainsi notre hypothèse de la participation du CFTR dans les processus de migration. Cependant, nos résultats ne nous permettent pas de comprendre comment le CFTR pourrait contrôler le processus de migration cellulaire. Selon la littérature, Schiller *et al.* ont démontré que le CFTR pouvait réguler la formation du lamellipode dans la cellule en migration (171). Plusieurs modèles hypothétiques avaient été suggérés pour expliquer ce phénomène. En effet, le CFTR pourrait contribuer, directement ou via la régulation du canal NHE1, à l'augmentation du volume de la cellule durant le mouvement cellulaire ou encore, il pourrait réguler le pH extracellulaire local, affectant les interactions cellule-matrice impliquées dans l'adhésion cellulaire durant le processus migratoire (171). Sun *et al.* ont proposé, de leur côté, un mécanisme assez inusité par lequel le CFTR pourrait favoriser la réparation de l'épithélium de trachée de singe rhesus, modèle cellulaire très proche de l'homme. En effet, il semblerait que le CFTR serait capable de guider les cellules en bord de plaies vers le site de lésion via la génération d'un champ électrique (173).

Dans nos cellules primaires humaines des voies aériennes, nous avons observé de la prolifération cellulaire au niveau de la monocouche cellulaire intacte, mais également dans les cellules en bord de plaie. Ceci signifierait que les cellules, directement impliquées dans le

processus de refermeture de plaie, ont la capacité de recouvrir la région lésée et de la repeupler. Encore une fois, nos résultats ont démontré l'implication du CFTR dans ce phénomène. En effet, nous avons mesuré une baisse du taux de prolifération cellulaire lorsque l'activité du CFTR était inhibée. De façon intéressante, il semblerait que le CFTR modulerait la prolifération de la même façon dans les cellules MDCK de type I, exprimant de façon endogène le canal (240). Cependant, contrairement à ce que nous avons observé, la littérature rapporte, plus souvent qu'autrement, une hyperprolifération dans l'épithélium FK. En effet, l'équipe du D<sup>re</sup> Coraux a démontré, par exemple, à l'aide de son modèle de régénération épithéliale de xénogreffe, que la phase proliférative dans les greffons FK était prolongée, ce qui retardait la phase de différenciation. L'épithélium régénéré FK résultant était plus épais et moins bien différencié qu'un épithélium non-FK (116). Dans une autre étude, il a été rapporté que la prolifération des cellules de l'épithélium intestinal était plus élevée dans des souris n'exprimant plus de CFTR (CFTR - /-). Les auteurs ont suggéré que l'absence de CFTR pouvait augmenter le pH cytosolique, ce qui induirait des signaux de prolifération ou la progression du cycle cellulaire (241). D'autres équipes ont également rapporté de l'hyperprolifération dans les polypes nasaux et au niveau de l'épithélium bronchique des patients FK (242-244). Il serait intéressant de savoir si le modèle cellulaire de notre étude pourrait être la cause de la divergence de ces résultats ou si simplement, le CFTR régulerait les processus de prolifération différemment en fonction du type cellulaire.

Le défaut de réparation de l'épithélium FK a également été rapporté dans d'autres études qui n'associent pas nécessairement ce défaut directement au canal CFTR. En effet, mes travaux de maîtrise avaient démontré que le délai de réparation des cellules bronchiques FK CuFi-1 était associé à une expression et une fonction réduite des canaux K<sup>+</sup> qui étaient couplées à une altération de la voie EGF/EGFR (149). Compte tenu du rôle majeur de cette voie de signalisation et des canaux K<sup>+</sup> dans les processus de réparation (123), il se pourrait donc que ces éléments jouent un rôle dans le défaut de réparation. Toutefois, nous n'avons pas confirmé ces observations dans des cellules humaines primaires. L'équipe du D<sup>re</sup> Coraux a plutôt proposé une dérégulation de la sécrétion d'IL-8 et de l'activité des MMP et de TIMP-1 (116). Une autre étude rapportait que le délai de réparation dans les cellules des voies aériennes FK pourrait être causé par de niveaux plus faibles de sphingolipides associés à une inhibition de la voie d'activation et de signalisation de la  $\beta$ 1-intégrine, qui limiterait ainsi le



processus migratoire (239). Enfin, le délai de réparation dans les cellules humaines primaires des voies aériennes FK a également été associé à une expression et une activité réduite du canal  $Cl^-$  activé par le  $Ca^{2+}$  ANO1, qui module également la migration et la prolifération cellulaire (167).

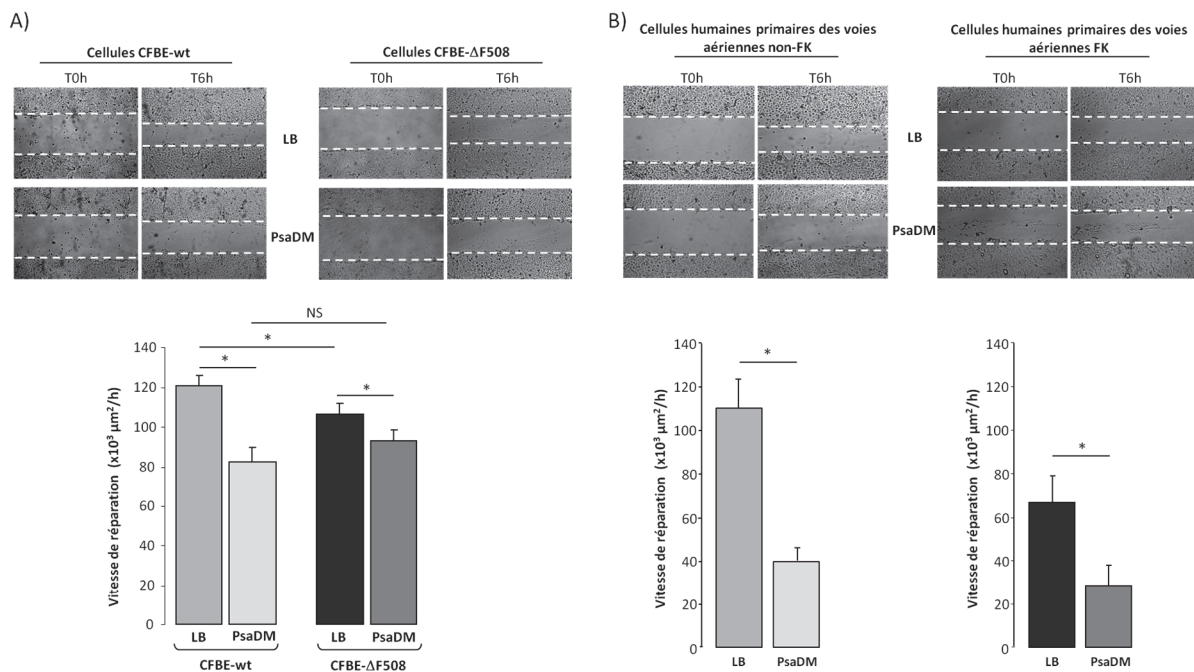
Toutes ces évidences suggèrent qu'il existe réellement un défaut de réparation de l'épithélium FK. Il se pourrait qu'il soit directement lié au canal CFTR, mais d'autres paramètres et voies cellulaires sembleraient également être perturbées par l'absence et/ou dysfonction de ce canal. Malgré la complexité de ce phénomène, il serait intéressant de mieux comprendre la contribution de chacun des paramètres et/ou facteurs au défaut de réparation de l'épithélium FK. Ainsi, nous pourrions identifier de nouvelles cibles pour développer des stratégies thérapeutiques afin de promouvoir la régénération épithéliale.

#### **4.2.2.2) Impact de l'infection sur la réparation de l'épithélium fibrose kystique**

L'infection est une composante majeure dans la pathogenèse de la FK. En effet, il existe plusieurs évidences démontrant que l'infection contribue au dommage et remodelage de l'épithélium des voies aériennes FK (69;96-100;111), ce qui entraînerait une diminution de la fonction pulmonaire et mènerait à la défaillance respiratoire. D'autre part, l'incapacité de l'épithélium des voies aériennes FK à se réparer/régénérer efficacement pourrait également être due à la présence de l'infection qui pourrait affecter les processus de réparation épithéliale. En effet, il semblerait aussi que les protéases sécrétées par les bactéries, ainsi que les neutrophiles recrutés suite à l'infection pouvaient, entre autres, dégrader les facteurs de croissance et leurs récepteurs à la surface des cellules (77). Comme Shute *et al.* l'ont souligné (104), ce phénomène pourrait peut-être expliquer pourquoi l'épithélium des voies aériennes FK ne se réparerait pas malgré la présence de concentrations élevées de facteurs de croissance.

Nous avons voulu, nous aussi, évaluer l'impact de l'infection sur les processus de réparation dans nos différents modèles cellulaires. Afin de mimer l'infection bactérienne, nous avons utilisé un filtrat d'une souche clinique de *P. aeruginosa* (CF508, isolée d'un patient  $\Delta$ F508 de l'Hôpital Ste-Justine) contenant les produits sécrétés par la bactérie, incluant des protéases et facteurs de virulence. En effet, comme montré à la **figure 13**, ce filtrat de *P. aeruginosa* (PsaDM) diminuait de façon significative la réparation dans les lignées cellulaires bronchiques non-FK (CFBE-wt) et FK (CFBE- $\Delta$ F508), mais également dans les cellules

humaines primaires des voies aériennes saines et FK (Trinh *et al.* données non-publiées). Tout comme nous, Jacobsen *et al.* ont démontré que l'ajout du filtrat bactérien de la souche de laboratoire de *P. aeruginosa* PA01 amenait une altération de la migration des kératinocytes, qu'ils ont associée aux facteurs de virulence lasR et RhIR (233). Cependant, dans notre cas, nous n'avons pas encore identifié le ou les facteur(s) pouvant être responsable(s) de cette réduction de la capacité de réparation. Suite à mes travaux de doctorat, des études sont actuellement en cours au laboratoire afin de définir quels sont les produits bactériens, ainsi que les voies de signalisation en aval, responsables de l'effet délétère sur les processus de réparation.



**FIGURE 13. Inhibition de la réparation épithéliale suite à un traitement avec le filtrat bactérien de *P. aeruginosa* dans les monocouches cellulaires non-FK et FK. A) Vitesses de réparation des monocouches de cellules bronchiques non-FK (CFBE-wt, gauche) et FK (CFBE-ΔF508, droite), pré-traitées pendant 24h avec 10% de milieu de culture (LB, *lysogeny broth*) ou de filtrat bactérien de *P. aeruginosa* (PsaDM) mesurées sur une période de 6h. (n=13, p<0.02) B) Vitesses de réparation des monocouches de cellules primaires des voies aériennes non-FK (gauche, n=9, p<0.01) et FK (droite, n=7, p<0.01), pré-traitées pendant 24h avec 1% de LB ou de PsaDM mesurées sur une période de 6h. Des photographies représentatives (magnification X4) sont présentées dans le haut des panneaux A et B. (Données non publiées.)**

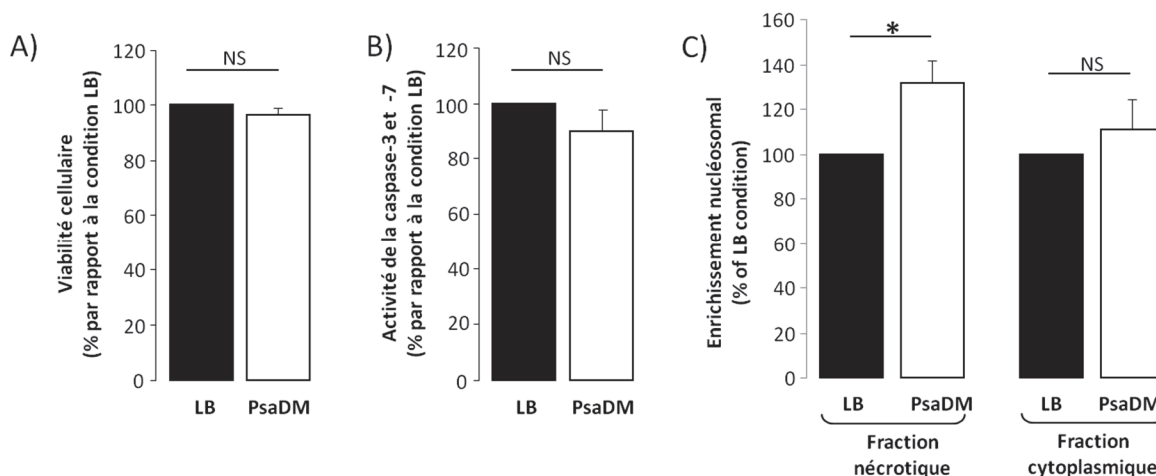
Plusieurs études ont démontré que les exoproduits bactériens pouvaient, en effet, affecter les processus de réparation, dont le processus migratoire. Les cytotoxines *exoT* et *exoS* ainsi que l'élastase de *P. aeruginosa* altèreraient les propriétés du cytosquelette d'actine et la formation d'adhésion focale dans la cellule en migration (95;96). Ces protéines pourraient ainsi grandement affecter la migration cellulaire nécessaire pour recouvrir la région lésée lors

du phénomène de réépithélisation. Basées sur ces évidences, ces exoproduits pourraient possiblement participer à l'inhibition de la réparation dans notre modèle.

Le rétablissement de l'intégrité épithéliale pourrait également être affecté par les exoproduits bactériens. En effet, la formation des jonctions serrées serait compromise par la diminution de l'expression des protéines ZO-1 et ZO-2 induite par l'exoA (96). D'autre part, l'élastase bactérienne ainsi que la protéine *homoserine lactone* C12 seraient capables de dégrader les jonctions serrées (77;96). L'exposition à la bactérie *P. aeruginosa* entraînerait une désorganisation des jonctions serrées, une diminution de la résistance transépithéliale et une augmentation de la perméabilité paracellulaire (100;235). Cependant, il a été démontré que ce phénomène pouvait être réversible, mais que la restauration de la barrière épithéliale demeurerait ralentie (100). Lors de nos expériences de mesure du courant court-circuit en chambre de Ussing, nous avons effectivement remarqué une résistance inférieure de nos monocouches cellulaires polarisées sur filtre en présence de PsaDM, comparativement à celle en condition contrôle. Ces observations suggèrent qu'un ou des exoproduits contenu(s) dans notre filtrat bactérien pouvaient altérer l'intégrité épithéliale de nos monocouches cellulaires.

D'autre part, il a été rapporté que différents produits bactériens pouvaient induire prématurément les phénomènes d'apoptose et de sénescence cellulaire. L'exoA peut en effet inhiber la biosynthèse des protéines chez la cellule-hôte entraînant ainsi sa mort cellulaire, alors que la protéine *homoserine lactone* C12 activerait la voie intrinsèque de l'apoptose (97;234). La pyocyanine, un facteur de virulence de *P. aeruginosa*, pourrait également induire un stress oxydatif qui causerait l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que l'apoptose (99;111). Cependant, des résultats préliminaires du laboratoire démontrent que le PsaDM, que nous avons utilisé, n'induisait pas d'apoptose marquée dans les cellules humaines primaires des voies aériennes (voir **figure 14**). Il se pourrait que des doses plus fortes que celles que nous avons utilisées aient un effet apoptotique plus marqué. Nous avons préféré toutefois rester à des doses modérées afin de ne pas entraîner une trop forte toxicité cellulaire. Nous avons toutefois noté une augmentation de l'enrichissement nucléosomal dans la fraction nécrotique pour la condition PsaDM. Il est à noter que, dans l'essai utilisé, la fraction nécrotique représente le surnageant des monocouches cellulaires. Ainsi, il se pourrait que les cellules dites nécrotiques soient mortes par apoptose ou une autre voie avant le début de l'essai. De plus, il existe d'autres voies de mort cellulaire programmée indépendantes des voies

classiques, telles que l'activation des caspases (245). Par conséquent, il se pourrait que nos différents tests n'arrivent pas à faire la distinction entre les types de morts cellulaires. Des expériences ultérieures permettront de répondre à cette question.



**Figure 14. Absence d'apoptose dans les monocouches cellulaires non-FK et FK suite à un traitement avec le filtrat bactérien de *P. aeruginosa*.** Les monocouches confluentes de cellules humaines primaires des voies aériennes ont été traitées pendant 24h avec 1% de milieu de culture (LB, *lysogeny broth*) ou de filtrat bactérien *P. aeruginosa* (PsaDM). **A)** La viabilité cellulaire a été évaluée par un test d'exclusion au Bleu de Trypan (n=7, NS). **B)** L'activité des caspases-3 et -7, reflétant le niveau d'apoptose dans les cellules exposées au PsaDM, ont été mesurée avec le Caspase-Glo® 3/7 Assay (n=6, NS). **C)** Les niveaux d'enrichissement nucléosomal (fragmentation de l'ADN) dans le surnageant (fraction nécrotique, n=7,  $p < 0.05$ ) et/ou dans les lysats cellulaires (fraction cytoplasmique, n=7, NS) ont été mesurés avec le kit Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> et donnent, respectivement, une estimation de la nécrose et de l'apoptose dans les monocouches cellulaires exposées au PsaDM. (*Données non publiées.*)

Même si l'épithélium des voies aériennes arrivait à se régénérer chez les patients FK, ce qui semble être le cas sur certaines des sections que nous avons analysées à partir des spécimens de poumons (comme mentionné à la **section 4.1.1**), la présence des protéases et exotoxines bactériennes pourraient l'endommager de nouveau. En effet, il a été démontré que l'élastase, la protéase alcaline, les protéases LasA, LasB et PASP pouvaient cliver et dégrader les protéines structurales entraînant ainsi des lésions au niveau de l'épithélium des voies aériennes FK (96;98). De plus, il semblerait que l'adhérence de *P. aeruginosa* soit plus importante sur un épithélium lésé et en cours de réparation. En effet, cette bactérie pourrait interagir directement avec l'épithélium et posséderait une grande affinité pour les cellules en bord de plaies et/en réparation (83;86;87;95), puisque son adhérence nécessiterait l'exposition de la fibronectine et de certains composés de la matrice extracellulaire (87). De plus, il semblerait que l'exoT, une exotoxine de *P. aeruginosa*, pourrait renverser les processus de réparation déjà enclenchés (95). Ainsi, sa présence accrue favoriserait davantage le développement de dommages à l'épithélium (95;98;100). En effet, une étude a émis

l'hypothèse que la déficience des processus de réparation dans les plaies chroniques serait en partie causée par la persistance des bactéries comme *P. aeruginosa* (69).

D'autres pathogènes présents dans les voies aériennes FK pourraient également affecter les processus de réparation. Par exemple, il a été rapporté que les facteurs de virulence de *S. aureus* pouvaient potentiellement causer des lésions épithéliales et affecter leur réparation (246). Dans les cellules Calu-3, une exposition à la bactérie *B. cepacia* induirait l'activation de la MMP-9, associée à un ralentissement de leur taux de réparation (247). Une autre étude proposait plutôt que *B. cepacia* diminuerait l'expression de la protéine ZO-1, perturbant ainsi l'intégrité épithéliale et diminuant la résistance transépithéliale (248). D'autre part, le facteur de virulence VacA de la bactérie *H. pylori* semblerait capable de diminuer la prolifération cellulaire. De plus, cette étude démontrait qu'un autre exoproduit, que VacA, contenu dans le filtrat bactérien de *H. pylori* pouvaient affecter à la fois la migration et la prolifération cellulaire, mais les auteurs ne l'ont pas encore identifié (249). Il se pourrait donc que les effets délétères sur la réparation que nous avons observés dans notre étude avec le PsaDM ne soient pas spécifiques et limités à la bactérie *P.aeruginosa*. Étant donné que les voies aériennes FK sont infectées avec différentes bactéries, il serait intéressant d'évaluer aussi leur impact sur les processus de régénération épithéliale.

#### **4.2.2.2.1) Impact de l'infection sur le CFTR dans le cadre de la réparation de l'épithélium fibrose kystique**

Après avoir démontré le rôle du canal CFTR dans les processus de réparation épithéliale, nous avons voulu évaluer l'impact de l'infection sur son expression et sa fonction. En effet, nous avons démontré que l'exposition pendant 24h à PsaDM réduisait les courants Cl<sup>-</sup> passant par CFTR non seulement dans la lignée cellulaire non-FK CFBE-wt, mais également dans les cellules humaines primaires des voies aériennes issues de patients non-FK. Pour tenter de comprendre comment le filtrat bactérien affectait la fonction du CFTR, nous avons mesuré l'expression génique et protéique du CFTR. Le PsaDM semblerait entraîner une diminution de l'expression protéique du canal dans les cellules CFBE-wt et CFBE-ΔF508, qui pourrait être associée à une baisse de la biosynthèse de la protéine ainsi qu'à un processus de dégradation plus accru. De façon similaire, Zahm *et al.* ont observé une diminution de l'expression de CFTR et des efflux de Cl<sup>-</sup>, lorsqu'ils incubaient leurs cellules glandulaires

trachéales avec un filtrat de *S. aureus* (246). Une étude de l'équipe du Dr Stanton proposait plutôt que, suite à une exposition de 4h à 6h au filtrat bactérien PA14, la baisse du courant Cl<sup>-</sup> transépithélial passant par CFTR et de son expression à la membrane était causée par une diminution du recyclage par les endosomes du CFTR-wt et -ΔF508 (250). Kong *et al.* ont suggéré que la pyocyanine sécrétée par *P. aeruginosa* pouvait diminuer l'expression et la mise en place à la membrane de CFTR, par un mécanisme encore inconnu (251). D'autre part, il a été démontré que la pyocyanine pouvait induire un stress oxydatif diminuant la fonction de CFTR (252). Toutefois, une étude de Cowley *et al.* avait démontré que l'application du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sur les cellules Calu-3 pouvait induire une augmentation rapide de l'efflux de Cl<sup>-</sup> par CFTR (253). En fait, cette étude avait exploré l'impact du stress oxydatif sur un temps relativement court, dans l'ordre des minutes. À l'inverse, Cantin *et al.* a démontré qu'une exposition prolongée au stress oxydatif pouvait affecter l'expression génique et protéique, mais également la fonction de CFTR (254). Enfin, le Cif (*CFTR inhibitory factor*) est une autre cytotoxine bactérienne sécrétée par *P. aeruginosa*, mais aussi par *B. cepacia*. Ce facteur pourrait aussi être responsable de l'effet délétère sur le CFTR, que nous avons observé, puisqu'il posséderait des propriétés inhibitrices pour l'expression et la fonction du CFTR (255). En effet, il a été démontré que le Cif pouvait induire une augmentation de la dégradation de CFTR dans les lysosomes en réduisant l'activité de USP10, l'enzyme responsable de la déubiquitination de CFTR dans les endosomes permettant son recyclage (256). Ainsi, l'impact délétère d'une exposition prolongée à notre filtrat bactérien sur l'expression et la fonction de CFTR pourrait découler de l'activité d'une ou de plusieurs protéine(s) sécrétée(s) par *P. aeruginosa*. Leur identification et une meilleure compréhension de leur mécanisme d'action permettraient de développer des stratégies pour contrecarrer leurs effets néfastes.

À l'inverse de ce que nous avons pu observer, l'exposition aiguë (quelques minutes) à certaines cytotoxines de *P. aeruginosa* seraient capables d'augmenter l'activité de CFTR (257). La flagelline (258) ainsi que l'homosérine lactone (259), par exemple, stimuleraient les courants Cl<sup>-</sup> passant par CFTR dans des cellules des voies aériennes saines. L'exoS induirait plutôt une augmentation de l'expression du CFTR à la surface cellulaire. En fait, elle diminuerait la dégradation du CFTR-wt en empêchant l'adressage de celui-ci vers les lysosomes (260). D'autre part, il a été suggéré que le CFTR pouvait être un récepteur du *P.*

*aeruginosa* (67) (261) (262). En effet, Haenish *et al.* ont proposé un modèle dans lequel la bactérie se lierait sur le canal CFTR et induirait ainsi son internalisation. Ce phénomène causerait par la suite la mise en place d'un nombre supérieur de canaux à la membrane pour remplacer ceux impliqués dans le processus de phagocytose, entraînant ainsi une augmentation de l'efflux d'iode par CFTR (257).

L'impact de l'infection sur les cellules pourrait dépendre du temps d'exposition. En effet, il a été proposé que des signes d'apoptose apparaissent seulement lorsque les cellules sont exposées de façon prolongée à la bactérie *P. aeruginosa* (262). Ainsi, l'infection en traitement chronique pourrait entraîner des effets délétères sur les fonctions cellulaires et peut-être même sur l'expression et la fonction de CFTR, comme nous l'avons observé. À l'inverse, l'augmentation du nombre et de la fonction des canaux CFTR, suite à des expositions plus courtes, constituerait peut-être un mécanisme cellulaire destiné à stimuler la clairance mucociliaire dans les voies aériennes afin d'éliminer les bactéries.

Suite à mes travaux, des études ont débutées au laboratoire afin de poursuivre l'étude de l'impact de l'infection sur l'expression et la fonction de CFTR. Des filtrats de différents souches de *P. aeruginosa*, fournis par le D<sup>re</sup> Dao Nguyen et le D<sup>r</sup> Simon Rousseau de l'Université McGill, sont présentement testés afin de comparer l'effet des souches mucoïdes et non-mucoïdes ainsi que de différents mutants (mutant de Cif, de LasR, LasI) sur les processus de réparation. Nous évaluons également l'impact d'autres bactéries, telles que *S. aureus*. Ces expériences nous permettront de mieux comprendre l'impact de l'infection sur la fonction de CFTR. Ces informations pourraient être importantes pour d'autres maladies pulmonaires. Par exemple, la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) est caractérisée par des infections répétées, ce qui pourraient affecter la fonction de CFTR et la clairance mucociliaire en favorisant ainsi davantage les infections bactériennes.

#### **4.2.2.3) L'impact de l'inflammation sur la réparation de l'épithélium fibrose kystique**

Lors de notre étude sur l'impact du filtrat bactérien (PsaDM) sur la fonction du CFTR et les processus de réparation, nous n'avons pas exploré la composante inflammatoire, qui pouvait découler d'une exposition de nos modèles cellulaires à des exoproduits bactériens. Cependant, il a été rapporté que, suite à une infection à *P. aeruginosa*, la sécrétion de plusieurs médiateurs inflammatoires pouvait être augmentée dans les cellules épithéliales

bronchiques FK IB3-1(263). Leur impact sur la réparation n'a toutefois pas été exploré. En fait, dans le cadre de la pathologie de la FK, peu d'études se sont concentrées à évaluer l'impact de l'inflammation sur les processus de réparation épithéliale. Cependant, Kanno *et al.* ont démontré, dans un modèle de plaies cutanées sur le rat, que l'inoculation de *P. aeruginosa* induisait un recrutement de neutrophiles au site de lésion et augmentait leur sécrétion de TNF- $\alpha$ , ce qui favoriserait la refermeture des plaies (129). Cette étude suggérait qu'une réponse inflammatoire dans les cellules épithéliales, suite à une infection, pourrait participer à la régulation des processus de réparation. De façon similaire, j'ai participé à une étude visant à définir l'impact de l'inflammation, plus précisément du TNF- $\alpha$ , sur la réparation épithéliale non-FK et FK (voir **annexe**) (137). Nos résultats démontraient que l'inflammation stimulait la réparation épithéliale ainsi que la migration cellulaire, tout comme Kanno *et al.* Cependant, dans notre étude, le TNF- $\alpha$  inhibait le processus de prolifération cellulaire. Ainsi, l'inflammation peut moduler les processus de réparation, mais son impact peut être plus complexe qu'attendu. Il serait ainsi probable qu'une réponse inflammatoire soit induite par le filtrat bactérien de *P. aeruginosa* PsaDM, et que celle-ci puisse contribuer à l'inhibition de la réparation épithéliale, mais probablement par un autre mécanisme que celui du TNF- $\alpha$ .

Suite à une infection, plusieurs TLR pourraient être activés et engendrer différentes réponses cellulaires, mais surtout générer différents impacts sur la réparation. Par exemple, Dasu *et al.* ont rapporté que l'activation du TLR-2 altérait la réparation des plaies dans des souris diabétiques (264), alors que dans un modèle similaire, Dieters *et al.* ont démontré que l'application d'un agoniste du TLR-2 stimulait la réparation (265). Les essais préliminaires que nous avons faits au laboratoire indiquent que la présence d'un anticorps neutralisant de TLR-2 renverserait très partiellement l'effet délétère de PsaDM sur la réparation épithéliale, tandis que l'application d'un ligand de TLR-2 inhiberait faiblement la réparation des monocouches de cellules primaires de voies aériennes non-FK. D'autre part, le LPS, un lipopolysaccharide retrouvé chez *P. aeruginosa* et *E. coli*, n'affecterait pas la migration de fibroblastes, mais celle des kératinocytes par l'activation des TLR-2 et TLR-4 (266). À l'inverse, Koff *et al.* ont mis en évidence une voie de signalisation favorisant la réparation dans les cellules des voies aériennes, par laquelle le LPS de *P. aeruginosa* activerait le TLR-4 (128). Les conséquences physiologiques, associées à l'activation des TLR à la suite d'une exposition à un pathogène, est un phénomène complexe et encore mal compris, ce qui peut



rendre difficile l'étude de l'impact de l'infection et l'inflammation sur les processus de réparation épithéliale.

#### **4.2.2.3.1) Impact de l'inflammation sur le CFTR dans le cadre de la réparation de l'épithélium fibrose kystique**

Par son rôle dans les processus de réparation épithéliale, il serait intéressant de voir comment l'inflammation pourrait affecter l'expression et la fonction de CFTR ainsi que son implication dans les phénomènes de régénération épithéliale. À ce jour et au meilleur de mes connaissances, aucune étude n'a encore exploré le lien entre l'inflammation, le CFTR et la réparation épithéliale. Cependant, plusieurs études suggèrent que l'inflammation pourrait réguler l'expression de CFTR. En fait, il a été rapporté que l'IL-1 $\beta$  aiderait à la stabilisation de l'ARNm de CFTR dans les cellules Calu-3 (267), ce qui pourrait dans notre modèle favoriser la réparation épithéliale. À l'inverse, quelques études démontrent que l'inflammation pourrait avoir des effets délétères sur le CFTR. En effet, il a été démontré que les cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$ , pouvaient réduire la stabilité et les niveaux d'ARNm de CFTR (25;227;268). De plus, une étude récente a proposé une nouvelle voie de dégradation du CFTR qui passerait via l'activation des protéases calpaïnes par l'élastase neutrophilique (269). Cependant, dans certains modèles de trachées humaines et de souris FK, il a été suggéré qu'il n'existait pas de lien entre la réponse inflammatoire induite par *P. aeruginosa* et la maturation du canal CFTR (270). Ainsi, il n'existe pas pour l'instant de consensus concernant l'impact de l'inflammation sur l'expression et la fonction du CFTR et la réponse inflammatoire en FK demeure encore un domaine très complexe, mais qui mérite d'être exploré.

#### **4.2.3) La correction de CFTR dans l'épithélium fibrose kystique**

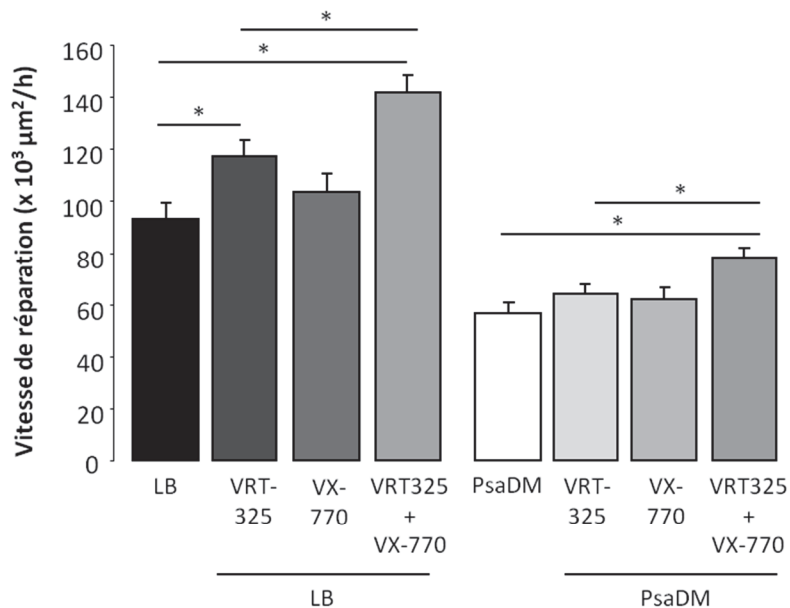
Au cours des dernières années, la communauté scientifique FK a commencé à s'intéresser aux thérapies adaptées à chaque classe de mutations. En effet, comme décrit à la **section 1.4.7.3**, plusieurs molécules ont été développées afin d'aider la maturation et l'adressage à la membrane de la protéine mutée CFTR- $\Delta$ F508. Étant donné que nos résultats démontraient une implication directe du canal CFTR dans les processus de réparation épithéliale, nous avons proposé que la correction du CFTR pouvait améliorer le délai de réparation que présentait l'épithélium FK. D'ailleurs, lorsque nous avons comparé des lignées

cellulaires transduites avec du CFTR-wt avec la lignée FK correspondante, nous avons observé une augmentation du taux de réparation. Suite à l'application du correcteur VRT-325, nous avons mesuré des courants Cl<sup>-</sup> activés par l'AMPc dans des cellules CFBE-ΔF508, mais également dans des cellules primaires des voies aériennes FK. Ces résultats permettaient de confirmer que le composé VRT-325 pouvait réellement corriger la maturation et favoriser la mise en place de canaux CFTR-ΔF508 partiellement fonctionnels à la membrane dans des cellules FK. Cependant, notre découverte la plus intéressante a été que le correcteur VRT-325 permettait une amélioration de la capacité de réparation des monocouches de cellules FK. En effet, nous avons noté une augmentation de la vitesse de réparation dans des monocouches de cellules CFBE-ΔF508. Nous avons été agréablement surpris de constater que cette amélioration de la réparation était beaucoup plus importante et marquée dans les cellules primaires humaines bronchiques provenant de patients FK greffés. Ainsi, nous avons démontré pour la première fois que les correcteurs du CFTR pouvaient non seulement corriger le défaut de base de CFTR, mais aussi favoriser la régénération épithéliale FK, augmentant ainsi l'intérêt thérapeutique de ces correcteurs.

Différents modes d'action des correcteurs ont été mis en évidence (229) et ils semblent pouvoir se lier à différents sites sur le CFTR. Ainsi, chaque classe de correcteur, en fonction de leur mode d'action, pourrait contribuer de façon complémentaire à la correction du canal CFTR. En effet, Farinha *et al.* ont effectivement noté un effet additif sur la correction de la protéine lors de la combinaison des correcteurs Vx-809 et VRT-325 (228). Les correcteurs peuvent être classés en trois catégories distinctes. Il y a ceux qui ciblent : 1) les interfaces entre le NBD et le MSD1 ainsi qu'entre le NBD1 et le MSD2, 2) le défaut d'assemblage du NBD2, et 3) le défaut énergétique du NBD1-ΔF508 (229). Ainsi, ce n'est pas seulement l'utilisation de différentes molécules correctrices, mais bien la combinaison de correcteurs ciblant spécifiquement chacun des défauts structuraux, qui serait une stratégie efficace pour la récupération d'une fonction suffisante de CFTR qui permettra une amélioration des paramètres cliniques chez les patients FK.

Une étude de Yu *et al.* a démontré que la correction du CFTR par le VRT-325 permettait le repliement partiel du NBD1. Cependant, le canal résultant posséderait tout de même un défaut d'activation (271) (272). En effet, par le passé, il a été démontré que le CFTR muté corrigé possédait, non seulement une demi-vie jusqu'à 6 fois plus courte qu'un CFTR wt

(202;227), mais qu'il répondait également moins bien à l'AMPc (203). Pour contourner ce problème, Yu *et al.* avaient proposé de conjuguer le potentiateur VX-770 au correcteur de CFTR, ce qui leur a permis de mesurer des courants Cl<sup>-</sup> plus élevés (271). En nous fiant sur ces évidences, nous avons évalué l'impact de la combinaison de ces deux composés sur les processus de réparation. Nos résultats préliminaires laissent croire que cette combinaison pourrait augmenter davantage la capacité des cellules à réparer. Comme démontré à la **figure 15**, l'addition du potentiateur VX-770 aux cellules traitées avec le correcteur VRT-325 en condition LB permet une amélioration plus importante de la réparation épithéliale comparativement à la condition de VRT-325 seule. Ceci permet, dans un premier temps, de confirmer que le CFTR joue réellement un rôle dans les processus de réparation, et montre également une nouvelle avancée pour ce type de thérapie adaptée à la classe de mutations.



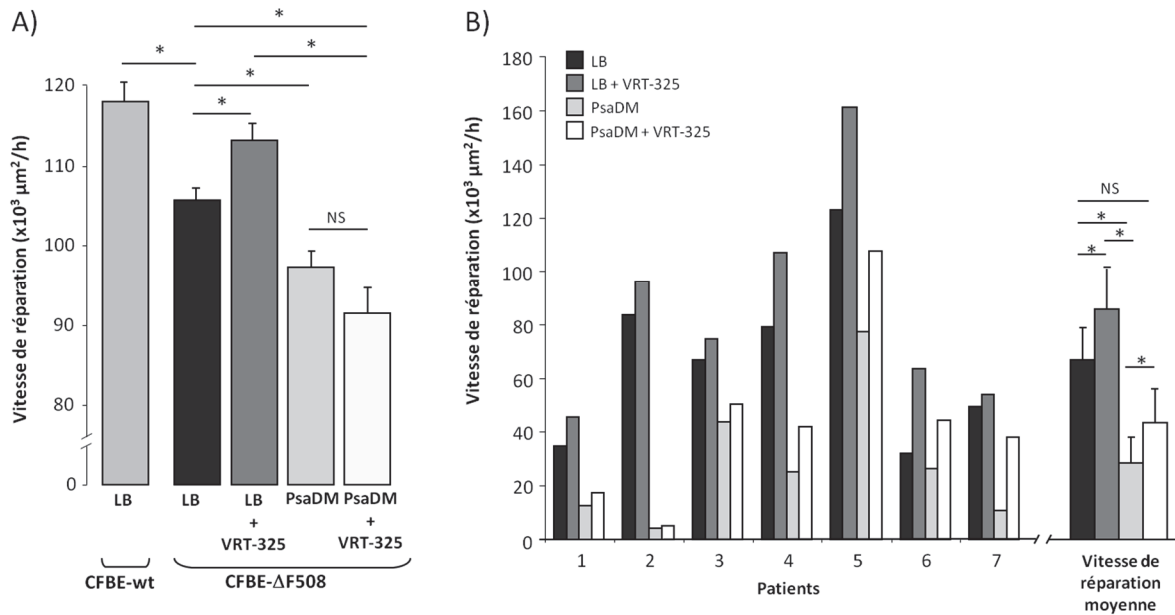
**FIGURE 15. Stimulation de la réparation épithéliale suite à un traitement avec le correcteur de CFTR VRT-325 et le potentiateur de CFTR VX-770.** Les vitesses de réparation des monocouches de cellules primaires des voies aériennes non-FK mesurées sur une période de 6h suite à une exposition de 24h avec 1% de milieu de culture (LB, *lysogeny broth*) ou de filtrat bactérien *P. aeruginosa* (PsaDM) pré-traitées 24h avec 5μM du correcteur VRT-325 ou 1h avec 1μM du potentiateur VX-770 ou en combinaison (n= 8 p< 0,03). (Données non publiées.)

#### 4.2.3.1) L'impact de l'infection sur la correction de CFTR dans l'épithélium fibrose kystique

La composante infectieuse, comme expliqué à la **section 4.1.2.2**, est dominante dans la pathologie de la FK et peut affecter également les processus de réparation. Puisque nous avons

mis en évidence le rôle de CFTR dans les processus de réparation et que nous avons observé un impact de l'infection sur la fonction de CFTR, nous avons ensuite décidé d'étudier l'effet de l'infection sur la correction du CFTR. En présence du filtrat PsaDM, nous avons d'abord observé une diminution drastique de la correction du CFTR, induite par le VRT-325, dans les cellules CFBE- $\Delta$ F508 tant au niveau protéique qu'au niveau fonctionnel. Par la suite, nous avons confirmé l'effet délétère des exoproduits de *P. aeruginosa* sur la fonction du CFTR corrigé dans les cellules humaines primaires des voies aériennes FK. Malheureusement, ceci démontre que l'infection affecterait la maturation et la correction de la fonction de CFTR par le correcteur VRT-325. De façon similaire, l'équipe du D<sup>r</sup> Stanton a démontré que le filtrat bactérien de *P. aeruginosa* (PA14) inhibait la fonction du CFTR- $\Delta$ F508 corrigé, dans ce cas-ci, par une exposition à faible température (250). En effet, par le passé, il avait été démontré qu'une baisse de la température (de 37°C à 29°C) permettait la suspension de la voie de dégradation ERAD (*endoplasmic reticulum-associated degradation*) et permettait ainsi une maturation du canal CFTR (273). Ensuite, de récentes évidences suggéreraient, dans un premier temps, que le correcteur Vx-809 était capable d'induire une sécrétion de Cl<sup>-</sup> dans des cellules humaines bronchiques FK, mais que cette correction pouvait être altérée en présence du filtrat bactérien PA14 (274), ce qui corrobore avec nos résultats.

En accord avec le fait que l'infection affecterait la correction du CFTR, nous avons observé que l'amélioration de la réparation induite par le VRT-325 était également compromise (voir **figure 16**). En fait, l'effet bénéfique sur la réparation était complètement aboli par le filtrat PsaDM dans les cellules CFBE- $\Delta$ F508 traitées avec le VRT-325 (PsaDM+VRT-325). Toutefois, nous sommes conscients que l'effet délétère du filtrat bactérien sur la réparation épithéliale stimulée par le VRT-325 n'est pas nécessairement causé par l'inhibition de la maturation du CFTR. Nous avons aussi observé, dans les cellules humaines primaires nasales et bronchiques issues de patients FK, que la présence de PsaDM causait une importante diminution du taux de réparation (PsaDM). Toutefois, l'ajout de VRT-325 a permis de récupérer une partie de la capacité de réparation des cellules FK (PsaDM+VRT-325). En effet, malgré une diminution de son effet bénéfique en présence de PsaDM, le traitement des cellules primaires FK au VRT-325 semblerait quand même améliorer légèrement, mais de façon significative, la réparation épithéliale comparativement à la condition de PsaDM seule. Ces résultats sembleraient tout de même indiquer que l'efficacité



**FIGURE 16.** L'amélioration de la réparation induite par le correcteur de CFTR VRT-325 est inhibée suite à une exposition au filtrat bactérien de *P. aeruginosa*. **A)** Vitesses de réparation des monocouches de cellules bronchiques non-FK (CFBE-wt) et FK (CFBE-ΔF508), mesurées sur une période de 6h suite à une exposition de 24h avec 10% de milieu de culture (LB, *lysogeny broth*) ou de filtrat bactérien *P. aeruginosa* (PsaDM) pré-traitées 24h avec 5μM du correcteur VRT-325 (n=5, p<0.03). **B)** Vitesses de réparation des monocouches de cellules primaires des voies aériennes FK mesurées sur une période de 6h suite à une exposition de 24h avec 1% de LB ou de PsaDM pré-traitées 24h avec 5μM du correcteur VRT-325 (n=7, p<0.02). (Données non publiées.)

de la correction pourrait être diminuée en présence d'infection, ce qui remettrait en perspective l'administration de ces composés chez des patients dont les voies respiratoires sont infectées de façon chronique. En fait, les études cliniques en cours, où le correcteur Vx-809 était administré à des patients FK, ont permis de mettre en évidence qu'une faible amélioration de la fonction pulmonaire. Nous ne pouvons pas affirmer que ce modeste effet puisse être dû à la composante infectieuse qui limiterait la correction du CFTR et la réparation épithéliale. Toutefois, ces phénomènes pourraient contribuer à limiter cette approche thérapeutique. Les études cliniques en cours combinant des traitements correcteur/potentioteurs (Vx-809/VX-770) indiquent une amélioration plus marquée de la fonction pulmonaire. Il est intéressant de remarquer que de la même façon, l'amélioration de la réparation est plus importante en présence de VRT-325 et VX-770, et ceci malgré la présence d'infection (voir **figure 15**).

Nous avons aussi observé que l'amélioration de la réparation des monocouches de cellules humaines primaires nasales et bronchiques issues de patients FK variait beaucoup d'un patient à l'autre. Il faut noter que nos spécimens provenaient de très jeunes patients (cellules épithéliales nasales en début de maladie), mais aussi des patients plus âgés et

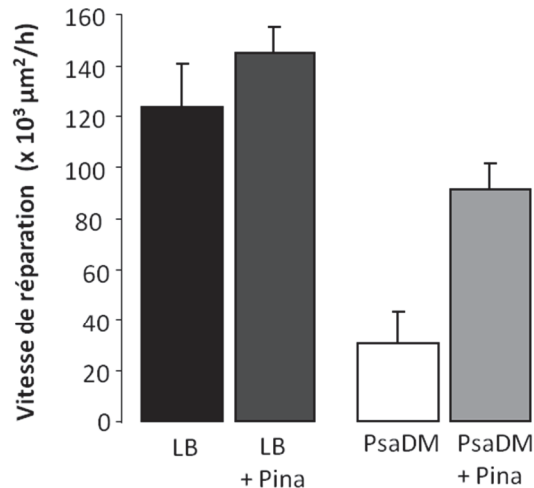
transplantés (cellules épithéliales bronchiques avec un stade plus avancé de la maladie). Dans notre étude, nous n'avons pas noté de corrélation entre la réponse au correcteur et l'atteinte plus ou moins sévère de la maladie. En fait, il a déjà été décrit que l'efficacité et le mécanisme d'action des correcteurs pouvaient varier en fonction du type cellulaire (55). Cependant, il se pourrait très bien que cette variation de l'efficacité des correcteurs soit aussi causée par un niveau d'infection plus ou moins sévère chez le patient. Basé sur nos observations que l'infection affecterait la maturation de CFTR induite par le VRT-325, il se pourrait qu'un patient, qui répondait bien à un correcteur en temps normal, y réponde moins bien en période d'exacerbation. Toutefois, à ce jour, aucune corrélation n'a été établie entre l'efficacité des correcteurs et le type de bactéries et/ou la sévérité de l'infection.

#### **4.2.3.2) Les alternatives possibles pour l'épithélium fibrose kystique**

Si le processus de maturation et d'adressage de CFTR induit par les correcteurs était effectivement altéré par la composante infectieuse, il serait important de définir des moyens pour contourner le problème ou de développer de nouvelles alternatives. D'abord, il faudrait comprendre comment l'infection affecte l'efficacité des correcteurs et/ou des potentiateurs. Ainsi, des composés efficaces, mais mieux adaptés à l'environnement hostile des voies aériennes FK pourraient être développés.

Par ailleurs, les canaux  $K^+$  pourraient constituer une alternative intéressante. En effet, la modulation des canaux  $K^+$  pourrait amener un éventail de bienfaits. Leur activation stimulerait la sécrétion de  $Cl^-$  via les canaux  $Cl^-$  alternatifs, ce qui permettrait une réhydratation partielle de l'ASL (60;275). Il semble que l'activité des canaux  $K^+$  régulerait également la réponse inflammatoire (276;277). De plus, comme expliqué en détail dans la revue de Girault *et al.*, l'activité des canaux  $K^+$  régulerait les phénomènes de migration et de prolifération cellulaire en condition normale et suite à des lésions, et ce dans plusieurs types cellulaires (123). En outre, durant mes travaux de maîtrise, nous avons démontré que les canaux  $K_{VLQT1}$ ,  $K_{ATP}$  et  $KCa3.1$  participaient aux processus de réparation épithéliale alvéolaire et bronchique (148;149).

Des résultats préliminaires au laboratoire (voir **figure 17**) suggèrent que l'activation du canal  $K_{ATP}$  par le pinacidil stimulerait la réparation des monocouches de cellules humaines primaires des voies aériennes non-FK en condition contrôle (LB+Pina) ainsi qu'en présence



**FIGURE 17. Amélioration de la réparation induite par l'activateur du canal K<sub>ATP</sub> en présence de filtrat bactérien de *P. aeruginosa*.** Les vitesses de réparation des monocouches de cellules primaires des voies aériennes non-FK mesurées sur une période de 6h suite à une exposition de 24h avec 1% de milieu de culture (LB, *lysogeny broth*) ou de filtrat bactérien *P. aeruginosa* (PsaDM) pré-traitées 24h avec 100μM de Pinacidil (Pina), l'activateur du canal K<sub>ATP</sub>. (n=3). (Données non publiées.)

du filtrat bactérien (PsaDM+Pina). De plus, les correcteurs de CFTR, tels que le VRT-325, pourraient être bénéfique non seulement pour le CFTR, mais aussi possiblement pour les canaux K<sup>+</sup>. En effet, il a été démontré que le VRT-325 était capable d'aider à la maturation du canal K<sup>+</sup> hERG (199). Il semblerait que ce canal K<sup>+</sup> puisse interagir et activer avec la β1-intégrine (voir revue de Girault *et al.* (123)), une composante importante dans la migration cellulaire. Il faudrait déterminer si ce canal participe aux processus de réparation épithéliale dans nos modèles cellulaires, et si c'est le cas, il est possible que l'effet bénéfique de l'application du VRT-325 ne dépende pas seulement de la correction de CFTR, mais également de celle sur le canal hERG. Ainsi, puisque le CFTR et les canaux K<sup>+</sup> joueraient conjointement un rôle crucial dans les processus de réparation épithéliale, la combinaison de correcteurs, de potentiateurs et des activateurs des canaux K<sup>+</sup> pourrait permettre de cumuler leurs effets bénéfiques sur la régénération épithéliale et constituer éventuellement une nouvelle avenue thérapeutique. Toutefois, les canaux K<sup>+</sup> sont exprimés de façon ubiquitaire dans les cellules de différents organes. C'est pourquoi les modulateurs de ces canaux devraient être utilisés avec précaution, peut-être par administration locale, afin d'éviter des effets systémiques non-désirés.

## Chapitre 5 – Conclusion

Le but de mon projet de doctorat aura été d'abord d'établir l'existence d'un défaut de base de réparation de l'épithélium des voies aériennes FK, d'investiguer le rôle du CFTR dans ce défaut et d'utiliser les correcteurs de CFTR pour stimuler la réparation épithéliale pour réduire ce délai de réparation. Le deuxième volet de mon projet aura été d'explorer l'impact de l'infection sur la fonction et sur la correction du CFTR.

Mon projet aura permis, en partie, de mieux comprendre les mécanismes de réparation épithéliale régissant l'épithélium FK afin de tenter de proposer de nouvelles approches thérapeutiques ciblant spécialement le CFTR, par l'utilisation de différents correcteurs, et ciblant potentiellement les canaux  $K^+$ . Il aura également permis de mieux comprendre comment l'effet délétère de l'infection pourrait affecter les facteurs régulant la réparation épithéliale, telle que la fonction du CFTR ainsi que l'amélioration de la réparation par les correcteurs de CFTR. Ces observations ont permis de soulever des questions importantes concernant l'efficacité des correcteurs en présence d'infection, ce qui devrait être pris en compte lors de l'évaluation des prochaines thérapies impliquant les correcteurs de CFTR.

Pour la suite du projet, il serait intéressant d'étudier plus finement le défaut de réparation de l'épithélium FK. En effet, selon différentes équipes, le délai de réparation serait causé par une altération de différents paramètres, tels qu'une fonction réduite des canaux  $K^+$  couplée à une diminution de la réponse à l'EGF (149), une diminution de l'expression et la fonction du canal  $Cl^-$  activé par le  $Ca^{2+}$  ANO1 (167), une diminution du niveau de sphingolipides affectant la voie d'activation et de signalisation de la  $\beta 1$ -intégrine (239) et une dérégulation de la sécrétion d'IL-8 et de l'activité des MMP et de TIMP-1 (116). Ces éléments pourraient être altérés par l'absence et/ou la dysfonction de CFTR ou il se pourrait que l'épithélium FK puisse simplement présenter d'autres défauts complètement indépendants du CFTR.

Nous pourrions également identifier le ou les exoproduit(s) contenu(s) dans le filtrat bactérien de *P. aeruginosa* responsable(s) des effets délétères observés sur le CFTR, la maturation du CFTR ainsi que la réparation épithéliale. Ceci nous permettrait de trouver des moyens pour contrecarrer ces effets afin de promouvoir la correction de CFTR et la régénération épithéliale. Pour ce faire, il est prévu d'utiliser des mutants de *P. aeruginosa* de



souche de laboratoire (PA01) dans lesquels des gènes ont été mutés pour étudier leur implication dans la pathogénicité de cette bactérie.

Ensuite, comme expliqué dans la **section 4.2.3**, nous pourrions aussi étendre notre champ d'étude à d'autres bactéries et pathogènes qui colonisent les voies aériennes FK, tels que *S. aureus*. En effet, il serait intéressant d'évaluer son impact seul et combiné à la bactérie *P. aeruginosa* sur la fonction du CFTR et les processus de réparation épithéliale FK afin de mieux comprendre la possible synergie entre ces bactéries au niveau des voies aériennes FK.

Un peu de la même manière, nous pourrions également déterminer la contribution de la composante inflammatoire sur le CFTR, sa maturation ainsi que les processus de réparation. Pour ce faire, nous pourrions faire des co-cultures de cellules épithéliales des voies aériennes avec des cellules immunes afin de déterminer l'impact des différents médiateurs inflammatoires et cytokines sur les processus de réparation épithéliale.

Enfin, nous pourrions aussi tester différents composés pour trouver la meilleure combinaison de correcteurs et de potentiateurs du CFTR, ainsi que d'activateurs des canaux  $K^+$  pour promouvoir la régénération épithéliale. Donc, la poursuite de ces différentes voies permettra éventuellement de développer de nouvelles avenues thérapeutiques plus ciblées et mieux adaptées pour promouvoir la régénération épithéliale dans les voies aériennes et stabiliser l'état des patients FK.

## **Bibliographie**

1. M. J. Stutts and R. C. Boucher. *Cystic fibrosis gene and functions of CFTR: implications of dysfunctional ion transport for pulmonary pathogenesis*. Anonymous. Anonymous. 1999.
2. M. Lim and P. L. Zeitlin. *Therapeutic strategies to correct malfunction of CFTR*. *Paediatr.Respir.Rev.* 2 (2):159-164, 2001.
3. P. E. DI SANT'AGNESE and D. H. ANDERSEN. *Cystic fibrosis of the pancreas*. *Prog.Pediatr.Study* (1 Vol.):160-176, 1948.
4. P. M. Quinton and J. Bijman. *Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis*. *N.Engl.J.Med.* 308 (20):1185-1189, 1983.
5. J. R. Riordan, J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou, and . *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*. *Science* 245 (4922):1066-1073, 1989.
6. A. M. Giddings and R. Maitra. *A disease-relevant high-content screening assay to identify anti-inflammatory compounds for use in cystic fibrosis*. *J.Biomol.Screen.* 15 (10):1204-1210, 2010.
7. R. Amin and F. Ratjen. *Emerging drugs for cystic fibrosis*. *Expert.Opin.Emerg.Drugs*, 2014.
8. A. W. Cuthbert. *New horizons in the treatment of Cystic Fibrosis*. *Br.J.Pharmacol.*, 2010.
9. R. K. Rowntree and A. Harris. *The phenotypic consequences of CFTR mutations*. *Ann.Hum.Genet.* 67 (Pt 5):471-485, 2003.
10. M. Dovey, C. L. Wisseman, V. L. Roggli, G. M. Roomans, J. D. Shelburne, and A. Spock. *Ultrastructural morphology of the lung in cystic fibrosis*. *J.Submicrosc.Cytol.Pathol.* 21 (3):521-534, 1989.
11. J. F. Engelhardt, M. Zepeda, J. A. Cohn, J. R. Yankaskas, and J. M. Wilson. *Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung*. *J.Clin.Invest* 93 (2):737-749, 1994.
12. M. D. Johnson. *Ion transport in alveolar type I cells*. *Mol.Biosyst.* 3 (3):178-186, 2007.
13. J. F. Engelhardt, J. R. Yankaskas, S. A. Ernst, Y. Yang, C. R. Marino, R. C. Boucher, J. A. Cohn, and J. M. Wilson. *Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus*. *Nat.Genet.* 2 (3):240-248, 1992.

14. R. G. Crystal, S. H. Randell, J. F. Engelhardt, J. Voynow, and M. E. Sunday. *Airway epithelial cells: current concepts and challenges*. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 5 (7):772-777, 2008.
15. R. C. Boucher. *Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia*. *Pflugers Arch.* 445 (4):495-498, 2003.
16. H. Matsui, S. H. Randell, S. W. Peretti, C. W. Davis, and R. C. Boucher. *Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces*. *J.Clin.Invest* 102 (6):1125-1131, 1998.
17. R. C. Boucher. *Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration*. *Trends Mol.Med.* 13 (6):231-240, 2007.
18. W. R. Thelin and R. C. Boucher. *The epithelium as a target for therapy in cystic fibrosis*. *Curr.Opin.Pharmacol.* 7 (3):290-295, 2007.
19. R. C. Boucher. *Human airway ion transport. Part two*. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 150 (2):581-593, 1994.
20. Y. Berthiaume, O. Lesur, and A. Dagenais. *Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium*. *Thorax* 54 (2):150-160, 1999.
21. S. T. Ballard, L. Trout, Z. Bebok, E. J. Sorscher, and A. Crews. *CFTR involvement in chloride, bicarbonate, and liquid secretion by airway submucosal glands*. *Am.J.Physiol* 277 (4 Pt 1):L694-L699, 1999.
22. S. T. Ballard and S. K. Inglis. *Liquid secretion properties of airway submucosal glands*. *J.Physiol* 556 (Pt 1):1-10, 2004.
23. L. C. Tsui and P. Durie. *Genotype and phenotype in cystic fibrosis*. *Hosp.Pract.(Minneap.)* 32 (6):115-9, 134, passim, 1997.
24. B. Lubamba, B. Dhooghe, S. Noel, and T. Leal. *Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy*. *Clin.Biochem.* 45 (15):1132-1144, 2012.
25. R. Bartoszewski, A. Rab, G. Twitty, L. Stevenson, J. Fortenberry, A. Piotrowski, J. P. Dumanski, and Z. Bebok. *The mechanism of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transcriptional repression during the unfolded protein response*. *J.Biol.Chem.* 283 (18):12154-12165, 2008.
26. T. Chinet. [*Physiopathology of cystic fibrosis lung disease*]. *Rev.Mal Respir.* 16 (3):339-345, 1999.
27. S. K. Inglis, S. G. Brown, M. J. Constable, N. McTavish, R. E. Olver, and S. M. Wilson. *A Ba<sup>2+</sup>-resistant, acid-sensitive K<sup>+</sup> conductance in Na<sup>+</sup>-absorbing H441*

- human airway epithelial cells. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 292 (5):L1304-L1312, 2007.
28. D. F. McAuley and J. S. Elborn. *Cystic fibrosis: basic science. Paediatr.Respir.Rev.* 1 (2):93-100, 2000.
  29. G. M. Braunstein, A. Zsembery, T. A. Tucker, and E. M. Schwiebert. *Purinergic signaling underlies CFTR control of human airway epithelial cell volume. J.Cyst.Fibros.* 3 (2):99-117, 2004.
  30. J. R. Riordan. *CFTR function and prospects for therapy. Annu.Rev.Biochem.* 77:701-726, 2008.
  31. J. P. Mornon, P. Lehn, and I. Callebaut. *Atomic model of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: membrane-spanning domains and coupling interfaces. Cell Mol.Life Sci.* 65 (16):2594-2612, 2008.
  32. M. Dorwart, P. Thibodeau, and P. Thomas. *Cystic fibrosis: recent structural insights. J.Cyst.Fibros.* 3 Suppl 2:91-94, 2004.
  33. D. N. Sheppard and M. J. Welsh. *Structure and function of the CFTR chloride channel. Physiol Rev.* 79 (1 Suppl):S23-S45, 1999.
  34. M. L. Drumm, D. J. Wilkinson, L. S. Smit, R. T. Worrell, T. V. Strong, R. A. Frizzell, D. C. Dawson, and F. S. Collins. *Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in Xenopus oocytes. Science* 254 (5039):1797-1799, 1991.
  35. M. P. Anderson, D. P. Rich, R. J. Gregory, A. E. Smith, and M. J. Welsh. *Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. Science* 251 (4994):679-682, 1991.
  36. C. E. Bear, F. Duguay, A. L. Naismith, N. Kartner, J. W. Hanrahan, and J. R. Riordan. *Cl<sup>-</sup> channel activity in Xenopus oocytes expressing the cystic fibrosis gene. J.Biol.Chem.* 266 (29):19142-19145, 1991.
  37. P. A. Sloane and S. M. Rowe. *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein repair as a therapeutic strategy in cystic fibrosis. Curr.Opin.Pulm.Med.* 16 (6):591-597, 2010.
  38. H. A. Lewis, S. G. Buchanan, S. K. Burley, K. Conners, M. Dickey, M. Dorwart, R. Fowler, X. Gao, W. B. Guggino, W. A. Hendrickson, J. F. Hunt, M. C. Kearins, D. Lorimer, P. C. Maloney, K. W. Post, K. R. Rajashankar, M. E. Rutter, J. M. Sauder, S. Shriver, P. H. Thibodeau, P. J. Thomas, M. Zhang, X. Zhao, and S. Emtage. *Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. EMBO J.* 23 (2):282-293, 2004.

39. H. A. Lewis, X. Zhao, C. Wang, J. M. Sauder, I. Rooney, B. W. Noland, D. Lorimer, M. C. Kearins, K. Conners, B. Condon, P. C. Maloney, W. B. Guggino, J. F. Hunt, and S. Emtage. *Impact of the deltaF508 mutation in first nucleotide-binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure. J.Biol.Chem.* 280 (2):1346-1353, 2005.
40. O. Moran, L. J. Galiotta, and O. Zegarra-Moran. *Binding site of activators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the nucleotide binding domains. Cell Mol.Life Sci.* 62 (4):446-460, 2005.
41. Z. Zhou, X. Wang, H. Y. Liu, X. Zou, M. Li, and T. C. Hwang. *The two ATP binding sites of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) play distinct roles in gating kinetics and energetics. J.Gen.Physiol* 128 (4):413-422, 2006.
42. P. Linsdell. *Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. Exp.Physiol* 91 (1):123-129, 2006.
43. J. W. Hanrahan and M. A. Wioland. *Revisiting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator structure and function. Proc.Am.Thorac.Soc.* 1 (1):17-21, 2004.
44. J. M. Baker, R. P. Hudson, V. Kanelis, W. Y. Choy, P. H. Thibodeau, P. J. Thomas, and J. D. Forman-Kay. *CFTR regulatory region interacts with NBD1 predominantly via multiple transient helices. Nat.Struct.Mol.Biol.* 14 (8):738-745, 2007.
45. W. B. Guggino and B. A. Stanton. *New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 7 (6):426-436, 2006.
46. C. O. Randak and M. J. Welsh. *Adenylate kinase activity in ABC transporters. J.Biol.Chem.* 280 (41):34385-34388, 2005.
47. X. Jiang, D. H. Ingbar, and S. M. O'Grady. *Adrenergic regulation of ion transport across adult alveolar epithelial cells: effects on Cl- channel activation and transport function in cultures with an apical air interface. J.Membr.Biol.* 181 (3):195-204, 2001.
48. L. L. Kulczycki, M. Kostuch, and J. A. Bellanti. *A clinical perspective of cystic fibrosis and new genetic findings: relationship of CFTR mutations to genotype-phenotype manifestations. Am.J.Med.Genet.A* 116A (3):262-267, 2003.
49. J. Zielenski. *Genotype and phenotype in cystic fibrosis. Respiration* 67 (2):117-133, 2000.
50. C. Castellani, H. Cuppens, M. Macek, Jr., J. J. Cassiman, E. Kerem, P. Durie, E. Tullis, B. M. Assael, C. Bombieri, A. Brown, T. Casals, M. Claustres, G. R. Cutting, E. Dequeker, J. Dodge, I. Doull, P. Farrell, C. Ferec, E. Girodon, M. Johannesson, B. Kerem, M. Knowles, A. Munck, P. F. Pignatti, D. Radojkovic, P. Rizzotti, M. Schwarz, M. Stuhmann, M. Tzetis, J. Zielenski, and J. S. Elborn. *Consensus on the*

*use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. J.Cyst.Fibros.* 7 (3):179-196, 2008.

51. T. W. Loo, M. C. Bartlett, and D. M. Clarke. *Correctors enhance maturation of DeltaF508 CFTR by promoting interactions between the two halves of the molecule. Biochemistry* 48 (41):9882-9890, 2009.
52. D. E. Grove, M. F. Rosser, H. Y. Ren, A. P. Naren, and D. M. Cyr. *Mechanisms for rescue of correctable folding defects in CFTRDelta F508. Mol.Biol.Cell* 20 (18):4059-4069, 2009.
53. P. H. Thibodeau, C. A. Brautigam, M. Machius, and P. J. Thomas. *Side chain and backbone contributions of Phe508 to CFTR folding. Nat.Struct.Mol.Biol.* 12 (1):10-16, 2005.
54. L. Cui, L. Aleksandrov, X. B. Chang, Y. X. Hou, L. He, T. Hegedus, M. Gentsch, A. Aleksandrov, W. E. Balch, and J. R. Riordan. *Domain interdependence in the biosynthetic assembly of CFTR. J.Mol.Biol.* 365 (4):981-994, 2007.
55. N. Pedemonte, V. Tomati, E. Sondo, and L. J. Galletta. *Influence of cell background on pharmacological rescue of mutant CFTR. Am.J.Physiol Cell Physiol* 298 (4):C866-C874, 2010.
56. E. A. Cowley and P. Linsdell. *Characterization of basolateral K<sup>+</sup> channels underlying anion secretion in the human airway cell line Calu-3. J.Physiol* 538 (Pt 3):747-757, 2002.
57. O. Bardou, N. T. Trinh, and E. Brochiero. *Molecular diversity and function of K<sup>+</sup> channels in airway and alveolar epithelial cells. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 296 (2):L145-L155, 2009.
58. C. Leroy, A. Dagenais, Y. Berthiaume, and E. Brochiero. *Molecular identity and function in transepithelial transport of K(ATP) channels in alveolar epithelial cells. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 286 (5):L1027-L1037, 2004.
59. C. Leroy, A. Prive, J. C. Bourret, Y. Berthiaume, P. Ferraro, and E. Brochiero. *Regulation of ENaC and CFTR expression with K<sup>+</sup> channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 291 (6):L1207-L1219, 2006.
60. M. Mall, T. Gonska, J. Thomas, R. Schreiber, H. H. Seydewitz, J. Kuehr, M. Brandis, and K. Kunzelmann. *Modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> secretion by basolateral K<sup>+</sup> channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia. Pediatr.Res.* 53 (4):608-618, 2003.
61. J. F. Chmiel, M. Berger, and M. W. Konstan. *The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. Clin.Rev.Allergy Immunol.* 23 (1):5-27, 2002.

62. S. Brezillon, F. Dupuit, J. Hinnrasky, V. Marchand, N. Kalin, B. Tummler, and E. Puchelle. *Decreased expression of the CFTR protein in remodeled human nasal epithelium from non-cystic fibrosis patients. Lab Invest* 72 (2):191-200, 1995.
63. J. Richman-Eisenstat. *Cytokine soup: making sense of inflammation in cystic fibrosis. Pediatr.Pulmonol.* 21 (1):3-5, 1996.
64. M. Mall, B. R. Grubb, J. R. Harkema, W. K. O'Neal, and R. C. Boucher. *Increased airway epithelial Na<sup>+</sup> absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. Nat.Med.* 10 (5):487-493, 2004.
65. R. C. Boucher. *New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. Eur.Respir.J.* 23 (1):146-158, 2004.
66. O. Ciofu, C. R. Hansen, and N. Hoiby. *Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. Curr.Opin.Pulm.Med.* 19 (3):251-258, 2013.
67. V. L. Campodonico, M. Gadjeva, C. Paradis-Bleau, A. Uluer, and G. B. Pier. *Airway epithelial control of Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. Trends Mol.Med.* 14 (3):120-133, 2008.
68. A. Folkesson, L. Jelsbak, L. Yang, H. K. Johansen, O. Ciofu, N. Hoiby, and S. Molin. *Adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. Nat.Rev.Microbiol.* 10 (12):841-851, 2012.
69. T. Bjarnsholt, K. Kirketerp-Moller, P. O. Jensen, K. G. Madsen, R. Phipps, K. Kroghfelt, N. Hoiby, and M. Givskov. *Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. Wound.Repair Regen.* 16 (1):2-10, 2008.
70. M. Manukyan, P. Nalbant, S. Luxen, K. M. Hahn, and U. G. Knaus. *RhoA GTPase activation by TLR2 and TLR3 ligands: connecting via Src to NF-kappa B. J.Immunol.* 182 (6):3522-3529, 2009.
71. W. Chang, J. Chen, C. F. Schlueter, and G. W. Hoyle. *Common pathways for activation of proinflammatory gene expression by G protein-coupled receptors in primary lung epithelial and endothelial cells. Exp.Lung Res.* 35 (4):324-343, 2009.
72. A. Chaturvedi and S. K. Pierce. *How location governs toll-like receptor signaling. Traffic.* 10 (6):621-628, 2009.
73. J. Lattin, D. A. Zidar, K. Schroder, S. Kellie, D. A. Hume, and M. J. Sweet. *G-protein-coupled receptor expression, function, and signaling in macrophages. J.Leukoc.Biol.* 82 (1):16-32, 2007.
74. B. J. Williams, J. Dehnbostel, and T. S. Blackwell. *Pseudomonas aeruginosa: host defence in lung diseases. Respiriology.* 15 (7):1037-1056, 2010.

75. H. Kumar, T. Kawai, and S. Akira. *Toll-like receptors and innate immunity. Biochem.Biophys.Res.Commun.* 388 (4):621-625, 2009.
76. M. Bencherif, P. M. Lippiello, R. Lucas, and M. B. Marrero. *Alpha7 nicotinic receptors as novel therapeutic targets for inflammation-based diseases. Cell Mol.Life Sci.*, 2010.
77. S. M. McCarty, C. A. Cochrane, P. D. Clegg, and S. L. Percival. *The role of endogenous and exogenous enzymes in chronic wounds: a focus on the implications of aberrant levels of both host and bacterial proteases in wound healing. Wound.Repair Regen.* 20 (2):125-136, 2012.
78. J. M. Courtney, M. Ennis, and J. S. Elborn. *Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. J.Cyst.Fibros.* 3 (4):223-231, 2004.
79. R. Robert, G. W. Carlile, C. Pavel, N. Liu, S. M. Anjos, J. Liao, Y. Luo, D. Zhang, D. Y. Thomas, and J. W. Hanrahan. *Structural analog of sildenafil identified as a novel corrector of the F508del-CFTR trafficking defect. Mol.Pharmacol.* 73 (2):478-489, 2008.
80. A. Di, M. E. Brown, L. V. Deriy, C. Li, F. L. Szeto, Y. Chen, P. Huang, J. Tong, A. P. Naren, V. Bindokas, H. C. Palfrey, and D. J. Nelson. *CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. Nat.Cell Biol.* 8 (9):933-944, 2006.
81. A. Di, X. Gao, J. Xue, G. Liu, K. Patel, K. Bachmaier, A. P. Naren, C. Tiruppathi, and A. B. Malik. *CFTR function of dendritic cells reveals a novel mechanism of inflammation in the cystic fibrosis lung. The FASEB Journal*, 2008. (Abstract)
82. Rose De, V. *Mechanisms and markers of airway inflammation in cystic fibrosis. Eur.Respir.J.* 19 (2):333-340, 2002.
83. Bentzmann S. De, P. Roger, and E. Puchelle. *Pseudomonas aeruginosa adherence to remodelling respiratory epithelium. Eur.Respir.J.* 9 (10):2145-2150, 1996.
84. K. W. Tsang, D. K. Shum, S. Chan, P. Ng, J. Mak, R. Leung, I. H. Shum, G. C. Ooi, G. L. Tipoe, and W. K. Lam. *Pseudomonas aeruginosa adherence to human basement membrane collagen in vitro. Eur.Respir.J.* 21 (6):932-938, 2003.
85. M. A. Esco, L. D. Hazlett, and M. Kurpakus-Wheater. *Pseudomonas aeruginosa binds to extracellular matrix deposited by human corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 43 (12):3654-3659, 2002.
86. P. Roger, E. Puchelle, O. Bajolet-Laudinat, J. M. Tournier, C. Debordeaux, M. C. Plotkowski, J. H. Cohen, D. Sheppard, and Bentzmann S. De. *Fibronectin and alpha5beta1 integrin mediate binding of Pseudomonas aeruginosa to repairing airway epithelium. Eur.Respir.J.* 13 (6):1301-1309, 1999.



87. Bentzmann S. De, C. Plotkowski, and E. Puchelle. *Receptors in the Pseudomonas aeruginosa adherence to injured and repairing airway epithelium. Am.J.Respir.Crit Care Med.* 154 (4 Pt 2):S155-S162, 1996.
88. W. Shi, S. Bellusci, and D. Warburton. *Lung development and adult lung diseases. Chest* 132 (2):651-656, 2007.
89. J. F. Chmiel and M. W. Konstan. *Inflammation and anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis. Clin.Chest Med.* 28 (2):331-346, 2007.
90. A. M. Cantin. *Potential for antioxidant therapy of cystic fibrosis. Curr.Opin.Pulm.Med.* 10 (6):531-536, 2004.
91. M. N. Becker, M. S. Sauer, M. S. Muhlebach, A. J. Hirsh, Q. Wu, M. W. Verghese, and S. H. Randell. *Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells. Am.J.Respir.Crit Care Med.* 169 (5):645-653, 2004.
92. D. P. Nichols, M. W. Konstan, and J. F. Chmiel. *Anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis-related lung disease. Clin.Rev.Allergy Immunol.* 35 (3):135-153, 2008.
93. D. R. Koehler, G. P. Downey, N. B. Swezey, A. K. Tanswell, and J. Hu. *Lung inflammation as a therapeutic target in cystic fibrosis. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 31 (4):377-381, 2004.
94. X. Liang and Y. Ji. *Involvement of alpha5beta1-integrin and TNF-alpha in Staphylococcus aureus alpha-toxin-induced death of epithelial cells. Cell Microbiol.* 9 (7):1809-1821, 2007.
95. T. K. Geiser, B. I. Kazmierczak, L. K. Garrity-Ryan, M. A. Matthay, and J. N. Engel. *Pseudomonas aeruginosa ExoT inhibits in vitro lung epithelial wound repair. Cell Microbiol.* 3 (4):223-236, 2001.
96. Bentzmann S. De, M. Polette, J. M. Zahm, J. Hinrasky, C. Kileztky, O. Bajolet, J. M. Klossek, A. Filloux, A. Lazdunski, and E. Puchelle. *Pseudomonas aeruginosa virulence factors delay airway epithelial wound repair by altering the actin cytoskeleton and inducing overactivation of epithelial matrix metalloproteinase-2. Lab Invest* 80 (2):209-219, 2000.
97. C. Schwarzer, Z. Fu, M. Patanwala, L. Hum, M. Lopez-Guzman, B. Illek, W. Kong, S. V. Lynch, and T. E. Machen. *Pseudomonas aeruginosa biofilm-associated homoserine lactone C12 rapidly activates apoptosis in airway epithelia. Cell Microbiol.* 14 (5):698-709, 2012.
98. A. Tang, M. E. Marquart, J. D. Fratkin, C. C. McCormick, A. R. Caballero, H. P. Gatlin, and R. J. O'Callaghan. *Properties of PASP: a Pseudomonas protease capable of mediating corneal erosions. Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 50 (8):3794-3801, 2009.

99. M. Muller. *Premature cellular senescence induced by pyocyanin, a redox-active Pseudomonas aeruginosa toxin. Free Radic.Biol.Med.* 41 (11):1670-1677, 2006.
100. J. Rejman, Gioia S. Di, A. Bragonzi, and M. Conese. *Pseudomonas aeruginosa infection destroys the barrier function of lung epithelium and enhances polyplex-mediated transfection. Hum.Gene Ther.* 18 (7):642-652, 2007.
101. I. Durieu, S. Peyrol, D. Gindre, G. Bellon, D. V. Durand, and Y. Pacheco. *Subepithelial fibrosis and degradation of the bronchial extracellular matrix in cystic fibrosis. Am.J.Respir.Crit Care Med.* 158 (2):580-588, 1998.
102. J. B. Watelet, Zele T. Van, M. Gjomarkaj, G. W. Canonica, S. E. Dahlen, W. Fokkens, V. J. Lund, G. K. Scadding, J. Mullol, N. Papadopoulos, S. Bonini, M. L. Kowalski, Cauwenberge P. Van, and J. Bousquet. *Tissue remodelling in upper airways: where is the link with lower airway remodelling? Allergy* 61 (11):1249-1258, 2006.
103. O. Sacco, M. Silvestri, F. Sabatini, R. Sale, A. C. Defilippi, and G. A. Rossi. *Epithelial cells and fibroblasts: structural repair and remodelling in the airways. Paediatr.Respir.Rev.* 5 Suppl A:S35-S40, 2004.
104. J. Shute, L. Marshall, K. Bodey, and A. Bush. *Growth factors in cystic fibrosis - when more is not enough. Paediatr.Respir.Rev.* 4 (2):120-127, 2003.
105. N. Regamey, P. K. Jeffery, E. W. Alton, A. Bush, and J. C. Davies. *Airway remodelling and its relationship to inflammation in cystic fibrosis. Thorax*, 2010.
106. H. A. Tiddens, S. H. Donaldson, M. Rosenfeld, and P. D. Pare. *Cystic fibrosis lung disease starts in the small airways: can we treat it more effectively? Pediatr.Pulmonol.* 45 (2):107-117, 2010.
107. C. Kampf, A. J. Relova, S. Sandler, and G. M. Roomans. *Effects of TNF-alpha, IFN-gamma and IL-beta on normal human bronchial epithelial cells. Eur.Respir.J.* 14 (1):84-91, 1999.
108. D. Knight. *Epithelium-fibroblast interactions in response to airway inflammation. Immunol.Cell Biol.* 79 (2):160-164, 2001.
109. M. Ahdieh, T. Vandenbos, and A. Youakim. *Lung epithelial barrier function and wound healing are decreased by IL-4 and IL-13 and enhanced by IFN-gamma. Am.J.Physiol Cell Physiol* 281 (6):C2029-C2038, 2001.
110. T. J. Venaille, G. Ryan, and B. W. Robinson. *Epithelial cell damage is induced by neutrophil-derived, not pseudomonas-derived, proteases in cystic fibrosis sputum. Respir.Med.* 92 (2):233-240, 1998.

111. M. Muller, Z. Li, and P. K. Maitz. *Pseudomonas pyocyanin inhibits wound repair by inducing premature cellular senescence: role for p38 mitogen-activated protein kinase. Burns* 35 (4):500-508, 2009.
112. Y. Yan, W. M. Gordon, and D. Y. Wang. *Nasal epithelial repair and remodeling in physical injury, infection, and inflammatory diseases. Curr.Opin.Otolaryngol.Head Neck Surg.* 21 (3):263-270, 2013.
113. B. Bertrand, S. Collet, P. Eloy, and P. Rombaux. *Secondary ciliary dyskinesia in upper respiratory tract. Acta Otorhinolaryngol.Belg.* 54 (3):309-316, 2000.
114. L. B. Ware and M. A. Matthay. *The acute respiratory distress syndrome. N.Engl.J.Med.* 342 (18):1334-1349, 2000.
115. X. Liu and J. F. Engelhardt. *The glandular stem/progenitor cell niche in airway development and repair. Proc.Am.Thorac.Soc.* 5 (6):682-688, 2008.
116. R. Hajj, P. Lesimple, B. Nawrocki-Raby, P. Birembaut, E. Puchelle, and C. Coraux. *Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. J.Pathol.* 211 (3):340-350, 2007.
117. A. Gaggar, A. Hector, P. E. Bratcher, M. A. Mall, M. Griese, and D. Hartl. *The role of matrix metalloproteases in cystic fibrosis lung disease. Eur.Respir.J.,* 2011.
118. J. Camara and G. Jarai. *Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF-alpha. Fibrogenesis.Tissue Repair* 3 (1):2, 2010.
119. H. Kasai, J. T. Allen, R. M. Mason, T. Kamimura, and Z. Zhang. *TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). Respir.Res.* 6:56, 2005.
120. N. Hirota and J. G. Martin. *Mechanisms of airway remodeling. Chest* 144 (3):1026-1032, 2013.
121. P. D. Vermeer, R. Harson, L. A. Einwalter, T. Moninger, and J. Zabner. *Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 28 (3):286-295, 2003.
122. C. Coraux, R. Hajj, P. Lesimple, and E. Puchelle. [*Repair and regeneration of the airway epithelium*]. *Med.Sci.(Paris)* 21 (12):1063-1069, 2005.
123. A. Girault and E. Brochiero. *Evidence of K<sup>+</sup> channel function in epithelial cell migration, proliferation, and repair. Am.J.Physiol Cell Physiol* 306 (4):C307-C319, 2014.

124. T. A. Wynn. *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. *J.Pathol.* 214 (2):199-210, 2008.
125. A. Schwab, A. Fabian, P. J. Hanley, and C. Stock. *Role of ion channels and transporters in cell migration*. *Physiol Rev.* 92 (4):1865-1913, 2012.
126. J. K. Kim, V. Vinarsky, J. Wain, R. Zhao, K. Jung, J. Choi, A. Lam, A. Pardo-Saganta, S. Breton, J. Rajagopal, and S. H. Yun. *In vivo imaging of tracheal epithelial cells in mice during airway regeneration*. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 47 (6):864-868, 2012.
127. H. Xiao, D. X. Li, and M. Liu. *Knowledge translation: airway epithelial cell migration and respiratory diseases*. *Cell Mol.Life Sci.* 69 (24):4149-4162, 2012.
128. J. L. Koff, M. X. Shao, S. Kim, I. F. Ueki, and J. A. Nadel. *Pseudomonas lipopolysaccharide accelerates wound repair via activation of a novel epithelial cell signaling cascade*. *J.Immunol.* 177 (12):8693-8700, 2006.
129. E. Kanno, K. Kawakami, M. Ritsu, K. Ishii, H. Tanno, S. Toriyabe, Y. Imai, R. Maruyama, and M. Tachi. *Wound healing in skin promoted by inoculation with Pseudomonas aeruginosa PAOI: The critical role of tumor necrosis factor-alpha secreted from infiltrating neutrophils*. *Wound.Repair Regen.* 19 (5):608-621, 2011.
130. R. Shaykhiev, J. Behr, and R. Bals. *Microbial patterns signaling via Toll-like receptors 2 and 5 contribute to epithelial repair, growth and survival*. *PLoS.One.* 3 (1):e1393, 2008.
131. W. A. Wallace, P. M. Fitch, A. J. Simpson, and S. E. Howie. *Inflammation-associated remodelling and fibrosis in the lung - a process and an end point*. *Int.J.Exp.Pathol.* 88 (2):103-110, 2007.
132. J. Portnoy, T. Pan, C. A. Dinarello, J. M. Shannon, J. Y. Westcott, L. Zhang, and R. J. Mason. *Alveolar type II cells inhibit fibroblast proliferation: role of IL-1alpha*. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 290 (2):L307-L316, 2006.
133. B. W. Booth, K. B. Adler, J. C. Bonner, F. Tournier, and L. D. Martin. *Interleukin-13 induces proliferation of human airway epithelial cells in vitro via a mechanism mediated by transforming growth factor-alpha*. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 25 (6):739-743, 2001.
134. S. Allahverdian, N. Harada, G. K. Singhera, D. A. Knight, and D. R. Dorscheid. *Secretion of IL-13 by airway epithelial cells enhances epithelial repair via HB-EGF*. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 38 (2):153-160, 2008.
135. G. M. Argast, J. S. Campbell, J. T. Brooling, and N. Fausto. *Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication*. *J.Biol.Chem.* 279 (33):34530-34536, 2004.

136. W. N. Chen, R. L. Woodbury, L. E. Kathmann, L. K. Opresko, R. C. Zangar, H. S. Wiley, and B. D. Thrall. *Induced autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor contributes to the response of mammary epithelial cells to tumor necrosis factor alpha*. *J.Biol.Chem.* 279 (18):18488-18496, 2004.
137. E. Maille, N. T. Trinh, A. Prive, C. Bilodeau, E. Bissonnette, N. Grandvaux, and E. Brochiero. *Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF-alpha after injury*. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 301 (6):L945-L955, 2011.
138. D. Xu, L. Wang, W. Dai, and L. Lu. *A requirement for K<sup>+</sup>-channel activity in growth factor-mediated extracellular signal-regulated kinase activation in human myeloblastic leukemia ML-1 cells*. *Blood* 94 (1):139-145, 1999.
139. B. Rouzair-Dubois, J. B. Milandri, S. Bostel, and J. M. Dubois. *Control of cell proliferation by cell volume alterations in rat C6 glioma cells*. *Pflugers Arch.* 440 (6):881-888, 2000.
140. W. F. Wonderlin and J. S. Strobl. *Potassium channels, proliferation and GI progression*. *J.Membr.Biol.* 154 (2):91-107, 1996.
141. A. Kleger, T. Seufferlein, D. Malan, M. Tischendorf, A. Storch, A. Wolheim, S. Latz, S. Protze, M. Porzner, C. Proepper, C. Brunner, S. F. Katz, Pusapati G. Varma, L. Bullinger, W. M. Franz, R. Koehntop, K. Giehl, A. Spyrantis, O. Wittekindt, Q. Lin, M. Zenke, B. K. Fleischmann, M. Wartenberg, A. M. Wobus, T. M. Boeckers, and S. Liebau. *Modulation of calcium-activated potassium channels induces cardiogenesis of pluripotent stem cells and enrichment of pacemaker-like cells*. *Circulation* 122 (18):1823-1836, 2010.
142. T. Watanabe, T. Fujii, T. Oya, N. Horikawa, Y. Tabuchi, Y. Takahashi, M. Morii, N. Takeguchi, K. Tsukada, and H. Sakai. *Involvement of aquaporin-5 in differentiation of human gastric cancer cells*. *J.Physiol Sci.* 59 (2):113-122, 2009.
143. Y. Zhou, T. L. Lewis, L. J. Robinson, K. M. Brundage, R. Schafer, K. H. Martin, H. C. Blair, J. Soboloff, and J. B. Barnett. *The role of calcium release activated calcium channels in osteoclast differentiation*. *J.Cell Physiol* 226 (4):1082-1089, 2011.
144. J. Y. Wang, J. Wang, V. A. Golovina, L. Li, O. Platoshyn, and J. X. Yuan. *Role of K(+) channel expression in polyamine-dependent intestinal epithelial cell migration*. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 278 (2):C303-C314, 2000.
145. A. Schwab, B. Schuricht, P. Seeger, J. Reinhardt, and P. C. Dartsch. *Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K<sup>+</sup> channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume*. *Pflugers Arch.* 438 (3):330-337, 1999.

146. A. Schwab, K. Gabriel, F. Finsterwalder, G. Folprecht, R. Greger, A. Kramer, and H. Oberleithner. *Polarized ion transport during migration of transformed Madin-Darby canine kidney cells. Pflugers Arch.* 430 (5):802-807, 1995.
147. G. Cruse, S. M. Duffy, C. E. Brightling, and P. Bradding. *Functional KCa3.1 K<sup>+</sup> channels are required for human lung mast cell migration. Thorax* 61 (10):880-885, 2006.
148. N. T. Trinh, A. Prive, L. Kheir, J. C. Bourret, T. Hijazi, M. G. Amraei, J. Noel, and E. Brochiero. *Involvement of K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 K<sup>+</sup> channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 293 (4):L870-L882, 2007.
149. N. T. Trinh, A. Prive, E. Maille, J. Noel, and E. Brochiero. *EGF and K<sup>+</sup> channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 295 (5):L866-L880, 2008.
150. M. J. Kim, G. Cheng, and D. K. Agrawal. *Cl<sup>-</sup> channels are expressed in human normal monocytes: a functional role in migration, adhesion and volume change. Clin.Exp.Immunol.* 138 (3):453-459, 2004.
151. A. Schwab, P. Hanley, A. Fabian, and C. Stock. *Potassium channels keep mobile cells on the go. Physiology.(Bethesda.)* 23:212-220, 2008.
152. A. Arcangeli and A. Becchetti. *Integrin structure and functional relation with ion channels. Adv.Exp.Med.Biol.* 674:1-7, 2010.
153. M. J. Davis, X. Wu, T. R. Nurkiewicz, J. Kawasaki, P. Gui, M. A. Hill, and E. Wilson. *Regulation of ion channels by integrins. Cell Biochem.Biophys.* 36 (1):41-66, 2002.
154. C. Roderick, P. S. Reinach, L. Wang, and L. Lu. *Modulation of rabbit corneal epithelial cell proliferation by growth factor-regulated K(+) channel activity. J.Membr.Biol.* 196 (1):41-50, 2003.
155. F. G. Toback, M. M. Walsh-Reitz, and S. Kartha. *Signals that release growth factors from renal epithelial cells. Am.J.Kidney Dis.* 17 (6):622-626, 1991.
156. G. Cheng, M. J. Kim, G. Jia, and D. K. Agrawal. *Involvement of chloride channels in IGF-I-induced proliferation of porcine arterial smooth muscle cells. Cardiovasc.Res.* 73 (1):198-207, 2007.
157. F. Lang, M. Foller, K. S. Lang, P. A. Lang, M. Ritter, E. Gulbins, A. Vereninov, and S. M. Huber. *Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. J.Membr.Biol.* 205 (3):147-157, 2005.
158. M. C. Shepherd, S. M. Duffy, T. Harris, G. Cruse, M. Schuliga, C. E. Brightling, C. B. Neylon, P. Bradding, and A. G. Stewart. *KCa3.1 Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels regulate*

- human airway smooth muscle proliferation. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 37 (5):525-531, 2007.
159. N. Villalonga, R. Martinez-Marmol, M. Roura-Ferrer, M. David, C. Valenzuela, C. Soler, and A. Felipe. *Cell cycle-dependent expression of Kv1.5 is involved in myoblast proliferation. Biochim.Biophys.Acta* 1783 (5):728-736, 2008.
160. S. P. Wang, J. A. Wang, R. H. Luo, W. Y. Cui, and H. Wang. *Potassium channel currents in rat mesenchymal stem cells and their possible roles in cell proliferation. Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 35 (9):1077-1084, 2008.
161. K. A. Woodfork, W. F. Wonderlin, V. A. Peterson, and J. S. Strobl. *Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. J.Cell Physiol* 162 (2):163-171, 1995.
162. W. F. Wonderlin, K. A. Woodfork, and J. S. Strobl. *Changes in membrane potential during the progression of MCF-7 human mammary tumor cells through the cell cycle. J.Cell Physiol* 165 (1):177-185, 1995.
163. J. E. Millership, D. C. Devor, K. L. Hamilton, C. M. Balut, J. I. Bruce, and I. M. Fearon. *Calcium Activated K<sup>+</sup> Channels Increase Cell Proliferation Independent of K<sup>+</sup> Conductance. Am.J.Physiol Cell Physiol*, 2010.
164. A. Felipe, R. Vicente, N. Villalonga, M. Roura-Ferrer, R. Martinez-Marmol, L. Sole, J. C. Ferreres, and E. Condom. *Potassium channels: new targets in cancer therapy. Cancer Detect.Prev.* 30 (4):375-385, 2006.
165. A. Wickenden. *K(+) channels as therapeutic drug targets. Pharmacol.Ther.* 94 (1-2):157-182, 2002.
166. J. Mao, L. Chen, B. Xu, L. Wang, W. Wang, M. Li, M. Zheng, H. Li, J. Guo, W. Li, T. J. Jacob, and L. Wang. *Volume-activated chloride channels contribute to cell-cycle-dependent regulation of HeLa cell migration. Biochem.Pharmacol.* 77 (2):159-168, 2009.
167. M. Ruffin, M. Voland, S. Marie, M. Bonora, E. Blanchard, S. Blouquit-Laye, E. Naline, P. Puyo, Rouzic P. Le, L. Guillot, H. Corvol, A. Clement, and O. Tabary. *Anoctamin 1 dysregulation alters bronchial epithelial repair in cystic fibrosis. Biochim.Biophys.Acta* 1832 (12):2340-2351, 2013.
168. F. Li, J. Yin, T. Yue, L. Liu, and H. Zhang. *The CLIC5 (chloride intracellular channel 5) involved in C2C12 myoblasts proliferation and differentiation. Cell Biol.Int.* 34 (4):379-384, 2010.
169. Y. B. Tang, Y. J. Liu, J. G. Zhou, G. L. Wang, Q. Y. Qiu, and Y. Y. Guan. *Silence of CLIC-3 chloride channel inhibits cell proliferation and the cell cycle via G/S phase arrest in rat basilar arterial smooth muscle cells. Cell Prolif.* 41 (5):775-785, 2008.

170. W. F. Yu, Y. L. Zhao, K. Wang, and M. M. Dong. *Inhibition of cell proliferation and arrest of cell cycle progression by blocking chloride channels in human laryngeal cancer cell line Hep-2. Neoplasma* 56 (3):224-229, 2009.
171. K. R. Schiller, P. J. Maniak, and S. M. O'Grady. *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair. Am.J.Physiol Cell Physiol* 299 (5):C912-C921, 2010.
172. K. L. Kirk. *CFTR channels and wound healing. Focus on "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair". Am.J.Physiol Cell Physiol* 299 (5):C888-C890, 2010.
173. Y. H. Sun, B. Reid, J. H. Fontaine, L. A. Miller, D. M. Hyde, A. Mogilner, and M. Zhao. *Airway epithelial wounds in rhesus monkey generate ionic currents that guide cell migration to promote healing. J.Appl.Physiol (1985.)* 111 (4):1031-1041, 2011.
174. G. I. Marino and B. A. Kotsias. *Cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) in human trophoblast BeWo cells and its relation to cell migration. Placenta* 35 (2):92-98, 2014.
175. J. Zabner, P. Karp, M. Seiler, S. L. Phillips, C. J. Mitchell, M. Saavedra, M. Welsh, and A. J. Klingelutz. *Development of cystic fibrosis and noncystic fibrosis airway cell lines. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 284 (5):L844-L854, 2003.
176. J. A. Wagner, A. H. Messner, M. L. Moran, R. Daifuku, K. Kouyama, J. K. Desch, S. Manley, A. M. Norbash, C. K. Conrad, S. Friborg, T. Reynolds, W. B. Guggino, R. B. Moss, B. J. Carter, J. J. Wine, T. R. Flotte, and P. Gardner. *Safety and biological efficacy of an adeno-associated virus vector-cystic fibrosis transmembrane regulator (AAV-CFTR) in the cystic fibrosis maxillary sinus. Laryngoscope* 109 (2 Pt 1):266-274, 1999.
177. J. A. Wagner, T. Reynolds, M. L. Moran, R. B. Moss, J. J. Wine, T. R. Flotte, and P. Gardner. *Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFTR in maxillary sinus. Lancet* 351 (9117):1702-1703, 1998.
178. B. R. Grubb, R. J. Pickles, H. Ye, J. R. Yankaskas, R. N. Vick, J. F. Engelhardt, J. M. Wilson, L. G. Johnson, and R. C. Boucher. *Inefficient gene transfer by adenovirus vector to cystic fibrosis airway epithelia of mice and humans. Nature* 371 (6500):802-806, 1994.
179. P. Anderson. *Emerging therapies in cystic fibrosis. Ther.Adv.Respir.Dis.* 4 (3):177-185, 2010.
180. L. Thompson. *Human gene therapy. Harsh lessons, high hopes. FDA.Consum.* 34 (5):19-24, 2000.



181. L. Smith and J. F. Byers. *Gene therapy in the post-Gelsinger era. JONAS.Healthc.Law Ethics Regul.* 4 (4):104-110, 2002.
182. F. Ratjen. *Recent advances in cystic fibrosis. Paediatr.Respir.Rev.* 9 (2):144-148, 2008.
183. D. K. Armstrong, S. Cunningham, J. C. Davies, and E. W. Alton. *Gene therapy in cystic fibrosis. Arch.Dis.Child,* 2014.
184. M. Stern, N. J. Caplen, J. E. Browning, U. Griesenbach, F. Sorgi, L. Huang, D. C. Gruenert, C. Marriot, R. G. Crystal, D. M. Geddes, and E. W. Alton. *The effect of mucolytic agents on gene transfer across a CF sputum barrier in vitro. Gene Ther.* 5 (1):91-98, 1998.
185. A. L. Friedlander and R. K. Albert. *Chronic macrolide therapy in inflammatory airways diseases. Chest* 138 (5):1202-1212, 2010.
186. M. W. Konstan and P. B. Davis. *Pharmacological approaches for the discovery and development of new anti-inflammatory agents for the treatment of cystic fibrosis. Adv.Drug Deliv.Rev.* 54 (11):1409-1423, 2002.
187. D. R. Bridge, K. H. Martin, E. R. Moore, W. M. Lee, J. A. Carroll, C. L. Rocha, and J. C. Olson. *Examining the role of actin-plasma membrane association in Pseudomonas aeruginosa infection and type III secretion translocation in migratory T24 epithelial cells. Infect.Immun.* 80 (9):3049-3064, 2012.
188. J. Jacquot, O. Tabary, Rouzic P. Le, and A. Clement. *Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. Int.J.Biochem.Cell Biol.* 40 (9):1703-1715, 2008.
189. D. J. Quinn, S. Weldon, and C. C. Taggart. *Antiproteases as therapeutics to target inflammation in cystic fibrosis. Open.Respir.Med.J.* 4:20-31, 2010.
190. A. M. Jones and J. M. Helm. *Emerging treatments in cystic fibrosis. Drugs* 69 (14):1903-1910, 2009.
191. S. A. Antoniu. *Cystic fibrosis transmembrane regulator potentiators as promising cystic fibrosis therapies. Expert.Opin.Investig.Drugs* 20 (3):423-425, 2011.
192. Inc PTC Therapeutics. *Top-Line Data from Phase 3 Trial of Ataluren in Patients with Nonsense Mutation Cystic Fibrosis Show Promising Results.* Anonymous. Anonymous. <http://ptct.client.shareholder.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=681445>. 2012. <http://ptct.client.shareholder.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=681445>
193. R. Melani, V. Tomati, L. J. Galietta, and O. Zegarra-Moran. *Modulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity and genistein binding by cytosolic pH. J.Biol.Chem.* 285 (53):41591-41596, 2010.

194. R. Derand, L. Bulteau-Pignoux, and F. Becq. *Comparative pharmacology of the activity of wild-type and G551D mutated CFTR chloride channel: effect of the benzimidazolone derivative NS004*. *J.Membr.Biol.* 194 (2):109-117, 2003.
195. Z. Cai and D. N. Sheppard. *Phloxine B interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at multiple sites to modulate channel activity*. *J.Biol.Chem.* 277 (22):19546-19553, 2002.
196. J. Bertrand, B. Boucherle, A. Billet, P. Melin-Heschel, L. Dannhoffer, C. Vandebrouck, C. Jayle, C. Routaboul, M. C. Molina, J. L. Decout, F. Becq, and C. Norez. *Identification of a novel water-soluble activator of wild-type and F508del CFTR: GPact-11a*. *Eur.Respir.J.* 36 (2):311-322, 2010.
197. Goor F. Van, S. Hadida, P. D. Grootenhuis, B. Burton, D. Cao, T. Neuberger, A. Turnbull, A. Singh, J. Joubran, A. Hazlewood, J. Zhou, J. McCartney, V. Arumugam, C. Decker, J. Yang, C. Young, E. R. Olson, J. J. Wine, R. A. Frizzell, M. Ashlock, and P. Negulescu. *Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106 (44):18825-18830, 2009.
198. A. D. Mills, C. Yoo, J. D. Butler, B. Yang, A. S. Verkman, and M. J. Kurth. *Design and synthesis of a hybrid potentiator-corrector agonist of the cystic fibrosis mutant protein DeltaF508-CFTR*. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 20 (1):87-91, 2010.
199. Goor F. Van, K. S. Straley, D. Cao, J. Gonzalez, S. Hadida, A. Hazlewood, J. Joubran, T. Knapp, L. R. Makings, M. Miller, T. Neuberger, E. Olson, V. Panchenko, J. Rader, A. Singh, J. H. Stack, R. Tung, P. D. Grootenhuis, and P. Negulescu. *Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules*. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 290 (6):L1117-L1130, 2006.
200. A. Jurkuvenaite, L. Chen, R. Bartoszewski, R. Goldstein, Z. Bebok, S. Matalon, and J. F. Collawn. *Functional stability of rescued delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway epithelial cells*. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 42 (3):363-372, 2010.
201. T. W. Loo and D. M. Clarke. *Chemical and pharmacological chaperones as new therapeutic agents*. *Expert.Rev.Mol.Med.* 9 (16):1-18, 2007.
202. G. L. Lukacs, X. B. Chang, C. Bear, N. Kartner, A. Mohamed, J. R. Riordan, and S. Grinstein. *The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells*. *J.Biol.Chem.* 268 (29):21592-21598, 1993.
203. T. C. Hwang, F. Wang, I. C. Yang, and W. W. Reenstra. *Genistein potentiates wild-type and delta F508-CFTR channel activity*. *Am.J.Physiol* 273 (3 Pt 1):C988-C998, 1997.

204. Y. Wang, T. W. Loo, M. C. Bartlett, and D. M. Clarke. *Additive effect of multiple pharmacological chaperones on maturation of CFTR processing mutants. Biochem.J.* 406 (2):257-263, 2007.
205. T. W. Loo, M. C. Bartlett, and D. M. Clarke. *Correctors promote folding of the CFTR in the endoplasmic reticulum. Biochem.J.* 413 (1):29-36, 2008.
206. T. S. Scott-Ward and M. D. Amaral. *Deletion of Phe508 in the first nucleotide-binding domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator increases its affinity for the heat shock cognate 70 chaperone. FEBS J.* 276 (23):7097-7109, 2009.
207. O. Kalid, M. Mense, S. Fischman, A. Shitrit, H. Bihler, E. Ben-Zeev, N. Schutz, N. Pedemonte, P. J. Thomas, R. J. Bridges, D. R. Wetmore, Y. Marantz, and H. Senderowitz. *Small molecule correctors of F508del-CFTR discovered by structure-based virtual screening. J.Comput.Aided Mol.Des* 24 (12):971-991, 2010.
208. Chiaw P. Kim, L. Wellhauser, L. J. Huan, M. Ramjeesingh, and C. E. Bear. *A chemical corrector modifies the channel function of F508del-CFTR. Mol.Pharmacol.* 78 (3):411-418, 2010.
209. Y. Wang, T. W. Loo, M. C. Bartlett, and D. M. Clarke. *Correctors promote maturation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-processing mutants by binding to the protein. J.Biol.Chem.* 282 (46):33247-33251, 2007.
210. J. M. Bomberger, W. B. Guggino, and B. A. Stanton. *Methods to monitor cell surface expression and endocytic trafficking of CFTR in polarized epithelial cells. Methods Mol.Biol.* 741:271-283, 2011.
211. H. M. Sampson, R. Robert, J. Liao, E. Matthes, G. W. Carlile, J. W. Hanrahan, and D. Y. Thomas. *Identification of a NBD1-Binding Pharmacological Chaperone that Corrects the Trafficking Defect of F508del-CFTR. Chem.Biol.* 18 (2):231-242, 2011.
212. L. Wellhauser, Chiaw P. Kim, S. Pasyk, C. Li, M. Ramjeesingh, and C. E. Bear. *A small-molecule modulator interacts directly with deltaPhe508-CFTR to modify its ATPase activity and conformational stability. Mol.Pharmacol.* 75 (6):1430-1438, 2009.
213. A. Billet, P. Melin, M. Jollivet, J. P. Mornon, I. Callebaut, and F. Becq. *C terminus of nucleotide binding domain 1 contains critical features for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking and activation. J.Biol.Chem.* 285 (29):22132-22140, 2010.
214. F. L. Stratford, M. M. Pereira, F. Becq, M. A. McPherson, and R. L. Dormer. *Benzo(c)quinolizinium drugs inhibit degradation of Delta F508-CFTR cytoplasmic domain. Biochem.Biophys.Res.Commun.* 300 (2):524-530, 2003.

215. R. L. Dormer, R. Derand, C. M. McNeilly, Y. Mettey, L. Bulteau-Pignoux, T. Metaye, J. M. Vierfond, M. A. Gray, L. J. Galietta, M. R. Morris, M. M. Pereira, I. J. Doull, F. Becq, and M. A. McPherson. *Correction of delF508-CFTR activity with benzo(c)quinolizinium compounds through facilitation of its processing in cystic fibrosis airway cells. J.Cell Sci.* 114 (Pt 22):4073-4081, 2001.
216. M. C. Dehecchi, E. Nicolis, C. Norez, V. Bezzerri, M. Borgatti, I. Mancini, P. Rizzotti, C. M. Ribeiro, R. Gambari, F. Becq, and G. Cabrini. *Anti-inflammatory effect of mighustat in bronchial epithelial cells. J.Cyst.Fibros.* 7 (6):555-565, 2008.
217. C. Norez, S. Noel, M. Wilke, M. Bijvelds, H. Jorna, P. Melin, H. DeJonge, and F. Becq. *Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor mighustat. FEBS Lett.* 580 (8):2081-2086, 2006.
218. B. Lubamba, F. Huaux, J. Lebacq, E. Marbaix, B. Dhooghe, N. Panin, P. Wallemacq, and T. Leal. *Immunomodulatory activity of vardenafil on induced lung inflammation in cystic fibrosis mice. J.Cyst.Fibros.* 11 (4):266-273, 2012.
219. D. N. Sheppard. *Cystic Fibrosis: CFTR Correctors to the Rescue. Chem.Biol.* 18 (2):145-147, 2011.
220. R. Robert, G. W. Carlile, J. Liao, H. Balghi, P. Lesimple, N. Liu, B. Kus, D. Rotin, M. Wilke, H. R. de Jonge, B. J. Scholte, D. Y. Thomas, and J. W. Hanrahan. *Correction of the Delta phe508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking defect by the bioavailable compound glafenine. Mol.Pharmacol.* 77 (6):922-930, 2010.
221. J. P. Holleran, M. L. Glover, K. W. Peters, C. A. Bertrand, S. C. Watkins, J. W. Jarvik, and R. A. Frizzell. *Pharmacological rescue of the mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) detected by use of a novel fluorescence platform. Mol.Med.* 18:685-696, 2012.
222. J. P. Holleran, J. Zeng, R. A. Frizzell, and S. C. Watkins. *Regulated recycling of mutant CFTR is partially restored by pharmacological treatment. J.Cell Sci.* 126 (Pt 12):2692-2703, 2013.
223. Goor F. Van, S. Hadida, P. D. Grootenhuis, B. Burton, J. H. Stack, K. S. Straley, C. J. Decker, M. Miller, J. McCartney, E. R. Olson, J. J. Wine, R. A. Frizzell, M. Ashlock, and P. A. Negulescu. *Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 108 (46):18843-18848, 2011.
224. J. P. Clancy, S. M. Rowe, F. J. Accurso, M. L. Aitken, R. S. Amin, M. A. Ashlock, M. Ballmann, M. P. Boyle, I. Bronsveld, P. W. Campbell, Boeck K. De, S. H. Donaldson, H. L. Dorkin, J. M. Dunitz, P. R. Durie, M. Jain, A. Leonard, K. S. McCoy, R. B. Moss, J. M. Pilewski, D. B. Rosenbluth, R. C. Rubenstein, M. S. Schechter, M. Botfield, C. L. Ordonez, G. T. Spencer-Green, L. Vernillet, S. Wisseh, K. Yen, and M. W. Konstan. *Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR*

- corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. Thorax* 67 (1):12-18, 2012.
225. Anonymous. *Final Data from Phase 2 Combination Study of VX-809 and KALYDECO™ (ivacaftor) Showed Statistically Significant Improvements in Lung Function in People with Cystic Fibrosis Who Have Two Copies of the F508del Mutation*. Anonymous. Anonymous. 2012.
  226. M. P. Boyle, S. Bell, M. W. Konstan, S. A. McColley, S. Wisseh, and G. T. Spencer-Green. *VX-809, an investigational CFTR corrector, in combination with VX-770, an investigational CFTR potentiator, in subjects with CF and homozygous for F508del-CFTR mutation. Pediatr.Pulmonol.* 46: 2011. (Abstract)
  227. F. Dupuit, N. Kalin, S. Brezillon, J. Hinnrasky, B. Tummler, and E. Puchelle. *CFTR and differentiation markers expression in non-CF and delta F 508 homozygous CF nasal epithelium. J.Clin.Invest* 96 (3):1601-1611, 1995.
  228. C. M. Farinha, J. King-Underwood, M. Sousa, A. R. Correia, B. J. Henriques, M. Roxo-Rosa, A. C. Da Paula, J. Williams, S. Hirst, C. M. Gomes, and M. D. Amaral. *Revertants, Low Temperature, and Correctors Reveal the Mechanism of F508del-CFTR Rescue by VX-809 and Suggest Multiple Agents for Full Correction. Chem.Biol.* 20 (7):943-955, 2013.
  229. T. Okiyoneda, G. Veit, J. F. Dekkers, M. Bagdany, N. Soya, H. Xu, A. Roldan, A. S. Verkman, M. Kurth, A. Simon, T. Hegedus, J. M. Beekman, and G. L. Lukacs. *Mechanism-based corrector combination restores DeltaF508-CFTR folding and function. Nat.Chem.Biol.* 9 (7):444-454, 2013.
  230. S. M. Rowe, L. C. Pyle, A. Jurkevante, K. Varga, J. Collawn, P. A. Sloane, B. Woodworth, M. Mazur, J. Fulton, L. Fan, Y. Li, J. Fortenberry, E. J. Sorscher, and J. P. Clancy. *DeltaF508 CFTR processing correction and activity in polarized airway and non-airway cell monolayers. Pulm.Pharmacol.Ther.* 23 (4):268-278, 2010.
  231. E. Sondo, V. Tomati, E. Caci, A. I. Esposito, U. Pfeffer, N. Pedemonte, and L. J. Galletta. *Rescue of the mutant CFTR chloride channel by pharmacological correctors and low temperature analyzed by gene expression profiling. Am.J.Physiol Cell Physiol* 301 (4):C872-C885, 2011.
  232. C. L. Ward and R. R. Kopito. *Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. J.Biol.Chem.* 269 (41):25710-25718, 1994.
  233. J. N. Jacobsen, A. S. Andersen, and K. A. Krogfelt. *Impact of Pseudomonas aeruginosa quorum sensing on cellular wound healing responses in vitro. Scand.J.Infect.Dis.* 44 (8):615-619, 2012.

234. M. C. Plotkowski, H. C. Povoia, J. M. Zahm, G. Lizard, G. M. Pereira, J. M. Tournier, and E. Puchelle. *Early mitochondrial dysfunction, superoxide anion production, and DNA degradation are associated with non-apoptotic death of human airway epithelial cells induced by Pseudomonas aeruginosa exotoxin A.* *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 26 (5):617-626, 2002.
235. C. Coraux, C. Kileztky, M. Polette, J. Hinnrasky, J. M. Zahm, P. Devillier, Bentzmann S. De, and E. Puchelle. *Airway epithelial integrity is protected by a long-acting beta2-adrenergic receptor agonist.* *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 30 (5):605-612, 2004.
236. M. Cohen-Cymerknoh, E. Kerem, T. Ferkol, and A. Elizur. *Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications.* *Thorax* 68 (12):1157-1162, 2013.
237. C. Hubeau, M. Lorenzato, J. P. Couetil, D. Hubert, D. Dusser, E. Puchelle, and D. Gaillard. *Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa.* *Clin.Exp.Immunol.* 124 (1):69-76, 2001.
238. J. L. Carson, A. M. Collier, T. M. Gambling, M. R. Knowles, and R. C. Boucher. *Ultrastructure of airway epithelial cell membranes among patients with cystic fibrosis.* *Hum.Pathol.* 21 (6):640-647, 1990.
239. Y. Itokazu, R. E. Pagano, A. S. Schroeder, S. M. O'Grady, A. H. Limper, and D. L. Marks. *Reduced GM1 Ganglioside in CFTR-Deficient Human Airway Cells Results in Decreased  $\alpha 1$ -integrin Signaling and Delayed Wound Repair.* *Am.J.Physiol Cell Physiol*, 2014.
240. H. Li, I. A. Findlay, and D. N. Sheppard. *The relationship between cell proliferation, Cl<sup>-</sup> secretion, and renal cyst growth: a study using CFTR inhibitors.* *Kidney Int.* 66 (5):1926-1938, 2004.
241. A. M. Gallagher and R. A. Gottlieb. *Proliferation, not apoptosis, alters epithelial cell migration in small intestine of CFTR null mice.* *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 281 (3):G681-G687, 2001.
242. S. Hassid, M. P. Degaute, S. Dawance, K. Rombaut, N. Nagy, G. Choufani, C. Decaestecker, A. Danguy, I. Salmon, and R. Kiss. *Determination of proliferative activity in nasal polyps.* *J.Clin.Pathol.* 50 (11):923-928, 1997.
243. M. W. Leigh, J. E. Kylander, J. R. Yankaskas, and R. C. Boucher. *Cell proliferation in bronchial epithelium and submucosal glands of cystic fibrosis patients.* *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 12 (6):605-612, 1995.
244. E. Lesprit, E. Escudier, G. Roger, V. Pruliere, G. Lenoir, P. Reinert, and A. Coste. *Characterization of inflammatory reaction in upper airways of cystic fibrosis patients.* *Histol.Histopathol.* 15 (2):395-402, 2000.

245. S. Barbier, L. Chatre, M. Bras, P. Sancho, G. Roue, C. Virely, V. J. Yuste, S. Baudet, M. Rubio, J. E. Esquerda, M. Sarfati, H. Merle-Beral, and S. A. Susin. *Caspase-independent type III programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia: the key role of the F-actin cytoskeleton*. *Haematologica* 94 (4):507-517, 2009.
246. J. M. Zahm, F. Delavoie, F. Toumi, B. Nawrocki-Raby, C. Kileztky, J. Michel, G. Balossier, M. Johnson, C. Coraux, and P. Birembaut. *Long acting beta2-agonist and corticosteroid restore airway glandular cell function altered by bacterial supernatant*. *Respir.Res.* 11:6, 2010.
247. C. Wright, R. Pilkington, M. Callaghan, and S. McClean. *Activation of MMP-9 by human lung epithelial cells in response to the cystic fibrosis-associated pathogen Burkholderia cenocepacia reduced wound healing in vitro*. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 301 (4):L575-L586, 2011.
248. C. Duff, P. G. Murphy, M. Callaghan, and S. McClean. *Differences in invasion and translocation of Burkholderia cepacia complex species in polarised lung epithelial cells in vitro*. *Microb.Pathog.* 41 (4-5):183-192, 2006.
249. V. Ricci, C. Ciacci, R. Zarrilli, P. Sommi, M. K. Tummuru, Blanco C. Del Vecchio, C. B. Bruni, T. L. Cover, M. J. Blaser, and M. Romano. *Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cell migration and proliferation in vitro: role of VacA and CagA*. *Infect.Immun.* 64 (7):2829-2833, 1996.
250. A. Swiatecka-Urban, S. Moreau-Marquis, D. P. Maceachran, J. P. Connolly, C. R. Stanton, J. R. Su, R. Barnaby, G. A. O'Toole, and B. A. Stanton. *Pseudomonas aeruginosa inhibits endocytic recycling of CFTR in polarized human airway epithelial cells*. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 290 (3):C862-C872, 2006.
251. F. Kong, L. Young, Y. Chen, H. Ran, M. Meyers, P. Joseph, Y. H. Cho, D. J. Hassett, and G. W. Lau. *Pseudomonas aeruginosa pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization*. *Cell Microbiol.* 8 (7):1121-1133, 2006.
252. C. Schwarzer, H. Fischer, E. J. Kim, K. J. Barber, A. D. Mills, M. J. Kurth, D. C. Gruenert, J. H. Suh, T. E. Machen, and B. Illek. *Oxidative stress caused by pyocyanin impairs CFTR Cl(-) transport in human bronchial epithelial cells*. *Free Radic.Biol.Med.* 45 (12):1653-1662, 2008.
253. E. A. Cowley and P. Linsdell. *Oxidant stress stimulates anion secretion from the human airway epithelial cell line Calu-3: implications for cystic fibrosis lung disease*. *J.Physiol* 543 (Pt 1):201-209, 2002.
254. A. M. Cantin, G. Bilodeau, C. Ouellet, J. Liao, and J. W. Hanrahan. *Oxidant stress suppresses CFTR expression*. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 290 (1):C262-C270, 2006.

255. D. P. Maceachran, S. Ye, J. M. Bomberger, D. A. Hogan, A. Swiatecka-Urban, B. A. Stanton, and G. A. O'Toole. *The Pseudomonas aeruginosa secreted protein PA2934 decreases apical membrane expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Infect.Immun.* 75 (8):3902-3912, 2007.
256. J. M. Bomberger, S. Ye, D. P. Maceachran, K. Koeppen, R. L. Barnaby, G. A. O'Toole, and B. A. Stanton. *A Pseudomonas aeruginosa toxin that hijacks the host ubiquitin proteolytic system. PLoS.Pathog.* 7 (3):e1001325, 2011.
257. M. D. Haenisch, T. A. Ciche, and D. B. Luckie. *Pseudomonas or LPS exposure alters CFTR iodide efflux in 2WT2 epithelial cells with time and dose dependence. Biochem.Biophys.Res.Comm.* 394 (4):1087-1092, 2010.
258. B. Illek, Z. Fu, C. Schwarzer, T. Banzon, S. Jalickee, S. S. Miller, and T. E. Machen. *Flagellin-stimulated Cl secretion and innate immune responses in airway epithelia: role for p38. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 295 (4):L531-L542, 2008.
259. C. Schwarzer, S. Wong, J. Shi, E. Matthes, B. Illek, J. P. Ianowski, R. J. Arant, E. Isacoff, H. Vais, J. K. Foskett, I. Maiellaro, A. M. Hofer, and T. E. Machen. *Pseudomonas aeruginosa Homoserine lactone activates store-operated cAMP and cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent Cl secretion by human airway epithelia. J.Biol.Chem.* 285 (45):34850-34863, 2010.
260. D. N. Tukaye, S. H. Kwon, and W. B. Guggino. *The GAP portion of Pseudomonas aeruginosa type III secreted toxin ExoS upregulates total and surface levels of wild type CFTR. Cell Physiol Biochem.* 31 (1):153-165, 2013.
261. S. H. Donaldson and R. C. Boucher. *Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. Curr.Opin.Pulm.Med.* 9 (6):486-491, 2003.
262. C. L. Cannon, M. P. Kowalski, K. S. Stopak, and G. B. Pier. *Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 29 (2):188-197, 2003.
263. M. Borgatti, V. Bezzetti, I. Mancini, E. Nicolis, M. C. Dehecchi, I. Lampronti, P. Rizzotti, G. Cabrini, and R. Gambari. *Induction of IL-6 gene expression in a CF bronchial epithelial cell line by Pseudomonas aeruginosa is dependent on transcription factors belonging to the Sp1 superfamily. Biochem.Biophys.Res.Comm.* 357 (4):977-983, 2007.
264. M. R. Dasu and R. R. Isseroff. *Toll-like receptors in wound healing: location, accessibility, and timing. J.Invest Dermatol.* 132 (8):1955-1958, 2012.
265. U. Deiters, M. Gumenscheimer, C. Galanos, and P. F. Muhlradt. *Toll-like receptor 2- and 6-mediated stimulation by macrophage-activating lipopeptide 2 induces lipopolysaccharide (LPS) cross tolerance in mice, which results in protection from*



- tumor necrosis factor alpha but in only partial protection from lethal LPS doses. Infect.Immun.* 71 (8):4456-4462, 2003.
266. C. Loryman and J. Mansbridge. *Inhibition of keratinocyte migration by lipopolysaccharide. Wound.Repair Regen.* 16 (1):45-51, 2008.
267. M. Baudouin-Legros, A. Hinzpeter, A. Jaulmes, F. Brouillard, B. Costes, P. Fanen, and A. Edelman. *Cell-specific posttranscriptional regulation of CFTR gene expression via influence of MAPK cascades on 3'UTR part of transcripts. Am.J.Physiol Cell Physiol* 289 (5):C1240-C1250, 2005.
268. R. Bartoszewski, A. Rab, A. Jurkuvenaite, M. Mazur, J. Wakefield, J. F. Collawn, and Z. Bebok. *Activation of the unfolded protein response by deltaF508 CFTR. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 39 (4):448-457, 2008.
269. Gars M. Le, D. Descamps, D. Roussel, E. Sausseureau, L. Guillot, M. Ruffin, O. Tabary, S. S. Hong, P. Boulanger, M. Paulais, L. Malleret, A. Belaouaj, A. Edelman, M. Huerre, M. Chignard, and J. M. Sallenave. *Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo. Am.J.Respir.Crit Care Med.* 187 (2):170-179, 2013.
270. M. C. Dechecchi, E. Nicolis, V. Bezzetti, A. Vella, M. Colombatti, B. M. Assael, Y. Mettey, M. Borgatti, I. Mancini, R. Gambari, F. Becq, and G. Cabrini. *MPB-07 reduces the inflammatory response to Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis bronchial cells. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 36 (5):615-624, 2007.
271. W. Yu, Chiaw P. Kim, and C. E. Bear. *Probing conformational rescue induced by a chemical corrector of F508del-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mutant. J.Biol.Chem.* 286 (28):24714-24725, 2011.
272. D. M. Cholon, W. K. O'Neal, S. H. Randell, J. R. Riordan, and M. Gentsch. *Modulation of endocytic trafficking and apical stability of CFTR in primary human airway epithelial cultures. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 298 (3):L304-L314, 2010.
273. G. M. Denning, M. P. Anderson, J. F. Amara, J. Marshall, A. E. Smith, and M. J. Welsh. *Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. Nature* 358 (6389):761-764, 1992.
274. S. Moreau-Marquis, R. L. Barnaby, B. A. Coutermarsh, and B. A. Stanton. *Pseudomonas aeruginosa reduces the ability of VX-809 to rescue deltaF508-CFTR chloride secretion and mucociliary transport by airway epithelial cells. Pediatr.Pulmonol.* volume 48: 2013. (Abstract)
275. D. C. Devor, R. J. Bridges, and J. M. Pilewski. *Pharmacological modulation of ion transport across wild-type and DeltaF508 CFTR-expressing human bronchial epithelia. Am.J.Physiol Cell Physiol* 279 (2):C461-C479, 2000.

276. N. Maruyama, Y. Kakuta, K. Yamauchi, Y. Ohkawara, T. Aizawa, T. Ohrui, M. Nara, T. Oshiro, I. Ohno, G. Tamura, and . *Quinine inhibits production of tumor necrosis factor-alpha from human alveolar macrophages. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 10 (5):514-520, 1994.
277. K. Pompermayer, F. A. Amaral, C. T. Fagundes, A. T. Vieira, F. Q. Cunha, M. M. Teixeira, and D. G. Souza. *Effects of the treatment with glibenclamide, an ATP-sensitive potassium channel blocker, on intestinal ischemia and reperfusion injury. Eur.J.Pharmacol.* 556 (1-3):215-222, 2007.
278. D. A. Stoltz, D. K. Meyerholz, A. A. Pezzulo, S. Ramachandran, M. P. Rogan, G. J. Davis, R. A. Hanfland, C. Wohlford-Lenane, C. L. Dohrn, J. A. Bartlett, G. A. Nelson, E. H. Chang, P. J. Taft, P. S. Ludwig, M. Estin, E. E. Hornick, J. L. Launspach, M. Samuel, T. Rokhlina, P. H. Karp, L. S. Ostedgaard, A. Uc, T. D. Starner, A. R. Horswill, K. A. Brogden, R. S. Prather, S. S. Richter, J. Shilyansky, P. B. McCray, Jr., J. Zabner, and M. J. Welsh. *Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. Sci.Transl.Med.* 2 (29):29ra31, 2010.
279. M. J. Welsh, C. S. Rogers, D. A. Stoltz, D. K. Meyerholz, and R. S. Prather. *Development of a porcine model of cystic fibrosis. Trans.Am.Clin.Climatol.Assoc.* 120:149-162, 2009.
280. X. Sun, H. Sui, J. T. Fisher, Z. Yan, X. Liu, H. J. Cho, N. S. Joo, Y. Zhang, W. Zhou, Y. Yi, J. M. Kinyon, D. C. Lei-Butters, M. A. Griffin, P. Naumann, M. Luo, J. Ascher, K. Wang, T. Frana, J. J. Wine, D. K. Meyerholz, and J. F. Engelhardt. *Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis. J.Clin.Invest* 120 (9):3149-3160, 2010.

## Annexe

## Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF- $\alpha$ after injury

Emilie Maillé,<sup>1,2\*</sup> Nguyen Thu Ngan Trinh,<sup>1,2\*</sup> Anik Privé,<sup>1</sup> Claudia Bilodeau,<sup>1</sup> Élyse Bissonnette,<sup>4</sup> Nathalie Grandvaux,<sup>1,3</sup> and Emmanuelle Brochiero<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)—Hôtel-Dieu, Montréal; <sup>2</sup>Département de médecine and <sup>3</sup>Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal; and <sup>4</sup>Institut Universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Département de médecine, Université Laval, Québec, Québec, Canada

Submitted 17 May 2011; accepted in final form 1 September 2011

**Maillé E, Trinh NT, Privé A, Bilodeau C, Bissonnette É, Grandvaux N, Brochiero E.** Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF- $\alpha$  after injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301: L945–L955, 2011. First published September 9, 2011; doi:10.1152/ajplung.00149.2011.—Chronic infection and inflammation have been associated with progressive airway epithelial damage in patients with cystic fibrosis (CF). However, the effect of inflammatory products on the repair capacity of respiratory epithelia is unclear. Our objective was to study the regulation of repair mechanisms by tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a major component of inflammation in CF, in a model of mechanical wounding, in two bronchial cell lines, non-CF NuLi and CF CuFi. We observed that TNF- $\alpha$  enhanced the NuLi and CuFi repair rates. Chronic exposure (24–48 h) to TNF- $\alpha$  augmented this stimulation as well as the migration rate during repair. The cellular mechanisms involved in this stimulation were then evaluated. First, we discerned that TNF- $\alpha$  induced metalloproteinase-9 release, epidermal growth factor (EGF) shedding, and subsequent EGF receptor transactivation. Second, TNF- $\alpha$ -induced stimulation of the NuLi and CuFi wound-closure rates was prevented by GM6001 (metalloproteinase inhibitor), EGF antibody (to titrate secreted EGF), and EGF receptor tyrosine kinase inhibitors. Furthermore, we recently reported a relationship between the EGF response and K<sup>+</sup> channel function, both controlling bronchial repair. We now show that TNF- $\alpha$  enhances KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> currents, while their inhibition abolishes TNF- $\alpha$ -induced repair stimulation. These results indicate that the effect of TNF- $\alpha$  is mediated, at least in part, through EGF receptor transactivation and K<sup>+</sup> channel stimulation. In contrast, cell proliferation during repair was slowed by TNF- $\alpha$ , suggesting that TNF- $\alpha$  could exert contrasting actions on repair mechanisms of CF airway epithelia. Finally, the stimulatory effect of TNF- $\alpha$  on airway wound repair was confirmed on primary airway epithelial cells, from non-CF and CF patients.

airways; inflammation; EGF receptor; K<sup>+</sup> channels; KvLQT1; K<sub>ATP</sub>

IN CYSTIC FIBROSIS (CF), mutations of the gene coding for the CF transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl<sup>-</sup> channel cause dysfunction of Cl<sup>-</sup> secretion, resulting in unbalanced Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> and fluid transport, thus reducing mucociliary clearance and favoring bacterial colonization and chronic inflammation in airways. The persistence of oxidants, proteases, and inflammatory mediators is central to the progression of lung damage and remodeling as well as the decline of lung function in patients with CF (for review see Refs. 17 and 52). Severe bronchiectasis is the most commonly observed structural ab-

normality in CF lungs. However, ultrastructural studies have also disclosed nonspecific ciliary anomalies, goblet and basal cell hyperplasia, squamous cell metaplasia, and decreased Clara cells (21, 30, 52).

In response to injury, epithelial tissues initiate repair processes in an attempt to restore the normal airway architecture. However, these processes seem ineffective in reestablishing epithelial integrity in patients with CF. It is not yet clear whether this inefficient repair is attributable to a basic repair default of CF airways (28, 56), to the severity of epithelial damage induced by infectious and inflammatory products, or to inflammation itself affecting the ability of CF airways to repair themselves. It is thus important to further study the regulatory mechanisms of airway epithelial repair by inflammatory cytokines. To date, it has been determined that epithelial repair involves multiple mechanisms, including 1) dedifferentiation, 2) adhesion/de-adhesion to the extracellular matrix (ECM) controlled by integrins and matrix metalloproteinases (MMPs), 3) spreading and migration of healthy cells, 4) cell proliferation, and 5) redifferentiation (49). These processes are modulated by several growth factors, including epidermal growth factor (EGF), through EGF receptors (EGFR), a convergent pathway producing motility and proliferative responses (32, 52, 57, 58). We have recently demonstrated the involvement of an autocrine EGF loop in the control of non-CF (NuLi) and CF (CuFi) bronchial repair processes (58). Moreover, K<sup>+</sup> channel function, particularly KvLQT1, K<sub>ATP</sub>, and KCa3.1, coupled with EGFR signaling, was found to be crucial for epithelial repair (58). Our study also highlighted a delay in repair of CuFi compared with NuLi monolayers, associated with reduced K<sup>+</sup> channel function and a lower EGF response in CuFi cells (58). Although EGF is key in bronchial repair, several other growth factors and inflammatory mediators might also regulate airway regeneration.

Chronic inflammation of lung tissue is a hallmark of CF lung physiopathology, and elevated levels of various proinflammatory cytokines are detected in CF airways (17, 35, 37). Among them, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) is a pivotal component of inflammation initiation and progression (35). Thus it is both beneficial in developing immune responses but also deleterious through amplification of inflammatory reactions and neutrophilic infiltration, leading to epithelial injury. TNF- $\alpha$  could also have opposing effects on repair mechanisms. For example, pro- (2, 15) and antiproliferative (6) actions of TNF- $\alpha$  as well as promigratory outcomes (15) have been reported in epithelial cells. Secondary activation by TNF- $\alpha$  of metalloproteinases [MMPs and a disintegrin and metalloproteases (ADAMs)] (2, 15, 65), which have been demonstrated to evoke EGFR ligand

\* E. Maillé and N. Thu Ngan Trinh made equal contributions to this manuscript.

Address for reprint requests and other correspondence: E. Brochiero, CRCHUM, Hôtel-Dieu, 3840, St-Urbain, Montréal, Québec, Canada H2W 1T8 (e-mail: [REDACTED]).

shedding in many cell types (8, 29, 33, 43, 64), could also induce the EGFR pathway (2, 15, 62). However, the impact of TNF- $\alpha$  on repair processes and the relationship between the TNF- $\alpha$  response and EGFR signaling in CF airways have never been defined. Finally, K<sup>+</sup> channels have been shown to be up- (22, 60, 61) or downregulated (60) by TNF- $\alpha$ , depending on the K<sup>+</sup> channel subtype and cell type. To the best of our knowledge, the influence of TNF- $\alpha$  on lung K<sup>+</sup> channels, involved in airway epithelial repair (58), has never been studied.

Our aim was thus to investigate the effects of acute and chronic exposure to TNF- $\alpha$  on the repair processes of NuLi and CuFi bronchial monolayers. Our results indicated that cell growth during repair was reduced by TNF- $\alpha$ , whereas cell migration and wound-healing rates were stimulated. We also evaluated the role of MMP and EGFR transactivation in TNF- $\alpha$ -induced wound healing. In addition, because K<sup>+</sup> channel activity is critical for bronchial repair, we examined coupling between TNF- $\alpha$  stimulation and K<sup>+</sup> channel function. Finally, the physiological impact of TNF- $\alpha$  on wound repair of human primary non-CF and CF cell monolayers was assessed.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell culture.** NuLi-1 (non-CF) and CuFi-1 (CF, homozygote  $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508) bronchial cells, gifted by Dr. J. Zabner, were used between passages 13 and 17 to avoid any phenotypic drift, as established originally (63). The cells were cultured in bronchial epithelial cell growth medium (BEBM; Lonza, Walkersville, MD) supplemented (BEGM<sup>+EGF</sup>) with hydrocortisone, bovine pituitary extract (BPE), transferrin, bovine insulin, triiodothyronine, epinephrine, retinoic acid, penicillin-streptomycin, geneticin, fluconazole, and EGF (0.5 ng/ml), in human collagen type VI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)-coated Petri dishes (58). Some experiments were performed in the absence of EGF (BEGM<sup>EGF-free</sup>) and/or BPE (BEGM<sup>EGF-BPE-free</sup>). For short-circuit current ( $I_{sc}$ ) studies in an Ussing chamber, cells were cultured on collagen VI-coated permeant filters (Costar Transwell, Toronto, ON) in DMEM/F-12 (GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY), supplemented with UrotrosterG (increasing ion transport, 2%; Biosepra, Cergy-Saint-Christophe, France), at the air-liquid interface (58).

Primary human airway epithelial cells were recovered after nasal polypectomy procedures at CHUM-Hôtel-Dieu (Montréal, Québec, Canada), according to an approved ethics protocol. After dissection, polyps were rinsed with PBS and then incubated with MEM (Invitrogen) supplemented with 7.5% NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES (Fisher, Nepean, ON, Canada), 0.05 mg/ml gentamycin, 25 U/ml penicillin-streptomycin, 0.25  $\mu$ g/ml Fongizone (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 0.1% pronase E (Sigma-Aldrich), and 10  $\mu$ g/ml DNase (Sigma-Aldrich), overnight, at 4°C, under gentle agitation. After neutralization of pronase-DNase activity with 10% FBS, the cells were gently scraped off the remaining tissue, and the cell suspension was recovered and centrifuged for 5 min at 1,500 revolution/min. The cell pellet was resuspended with 5 ml ACK lysis solution (0.1 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10  $\mu$ M KHCO<sub>3</sub>, 10 nM EDTA), incubated on ice for 5 min and then neutralized with 10% FBS. After cell suspension centrifugation, the cell pellet was resuspended, counted, and seeded on supports coated with Purecol (Cedarlane, Burlington, ON, Canada). The cells were grown in CnT17 medium (CellnTec Advanced Cell Systems, Bern, Switzerland) until confluence and then in complete SAGM (LHC basal medium supplemented with SAGM) (Clonetics, Walkersville, MD) and 25 ng/ml EGF, 100 U/ml of penicillin-streptomycin, 0.07  $\mu$ g/ml phosphorylthanolamine (Sigma-Aldrich), 1.86 ng/ml ethanolanamine (Sigma-Aldrich), 0.05 nM retinoic acid (Sigma-Aldrich), and stock 11, stock

4 and trace elements (kindly provided by Dr. Scott Randell, University of North Carolina).

**Wound healing.** NuLi, CuFi, and human primary cell monolayers were injured mechanically with a P10 pipette tip (6 wounds per Petri dish, 2 Petri dishes per condition) (58), then washed to remove detached injured cells. The mean area of the initial wounds was  $0.987 \pm 0.005$  mm<sup>2</sup>, with maximal variation of 5%, demonstrating the reproducibility of our scratch assay (57, 58). The monolayers were photographed with a digital camera under light microscopy ( $\times 4$  enlargement) at *time 0* and after 6 h in BEGM<sup>+EGF</sup> or 18 h in BEGM<sup>EGF-free</sup>. A mark on the Petri dishes allowed us to photograph the wounds exactly at the same place at various times and to measure, with ImageJ software, the wound area initially and after repair. Our results are reported as repair rates in  $\mu$ m<sup>2</sup>/h and compared with the outcome of different treatments (TNF- $\alpha$ , BioSource; Invitrogen, Carlsbad, CA), GM6001 (USBiological, Swampscott, MA), anti-EGF antibody (EGF-Ab; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), inhibitors of erbB1 (tyrphostin AG-1478) and erbB2 (tyrphostin AG-875), clofilium (a KvLQT1 channel blocker), glibenclamide (a K<sub>ATP</sub> channel blocker), and TRAM-34 (a KCa3.1 channel blocker) (Sigma-Aldrich) in BEGM<sup>+EGF</sup> or BEGM<sup>EGF-free</sup>.

**Cell proliferation.** Cell proliferation was evaluated by counting NuLi and CuFi cell number (1) before injury, (2) at *time 0* after injury, and (3) after 24 h of repair. Briefly, after culture in BEGM<sup>+EGF</sup> until confluence, the monolayers were washed with PBS, and the cells were separated with 0.25% trypsin-EDTA and then counted with an hemocytometer. The same method was employed to count the number of remaining cells at *time 0* after injury in NuLi and CuFi monolayers (treated or not with TNF- $\alpha$  after injury, in BEGM<sup>EGF-free</sup>) and after 24 h of repair (in the presence or absence of TNF- $\alpha$ , in BEGM<sup>EGF-free</sup>). The absence of cytotoxicity by TNF- $\alpha$  was verified by counting the number of detached cells as well as stained cells in Trypan-blue exclusion assay.

**Single-cell tracking of cell migration in time-lapse experiments.** The migratory capacity of NuLi and CuFi cells was evaluated by single-cell tracking in live time-lapse experiments after wounding. Confluent monolayers were treated or not for 48 h with TNF- $\alpha$  (in BEGM<sup>+EGF</sup>) before injury (wound width was reduced to one-third of the standard wound size to reduce the duration of these experiments and focus on cell migration). Images were captured at 2-min intervals over a 60-min period by digital camera connected to an Olympus microscope ( $\times 10$  enlargement). Image J software was used to track single cells (30 individual cells at the wound edge per experiment) and to calculate migration rates ( $\mu$ m/h, from 5 different experiments).

**EGFR/pEGFR expression by immunoblotting.** Total proteins were obtained from NuLi and CuFi cells cultured in BEGM<sup>+EGF</sup> for 10 days and in BEGM<sup>EGF-BPE-free</sup> for 18 h before protein extraction. EGFR and the phosphorylated form of EGFR (pEGFR) were detected by immunoblotting, with anti-erbB1 and anti-pEGFR<sup>845</sup> antibodies (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) (58). The intensity of pEGFR and EGFR bands was quantified with Multigauge software. The results are reported as the pEGFR/EGFR ratio, in percentage of the control condition.

**EGF shedding.** NuLi and CuFi cells were cultured until confluence in BEGM<sup>+EGF</sup>. Cell monolayers were then treated or not with TNF- $\alpha$  in BEBM for 24 h before conditioned medium collection. After centrifugation, the supernatants were concentrated on Amicon Ultra 3K filters (Millipore, Carrigtwohill, Ireland) and separated on 15% polyacrylamide-SDS gel. Pro-EGF and mature EGF bands were revealed by an EGF antibody (Santa Cruz Biotechnology). EGF band intensity, normalized by the pro-EGF signal, was quantified with Multigauge software and presented as a percentage of the control, nontreated condition.

**Gelatin zymography analysis.** NuLi and CuFi cell monolayers were wounded or not, and the medium was replaced by BEGM<sup>EGF-BPE-free</sup> supplemented or not with TNF- $\alpha$  and/or GM6001 for 24 h before conditioned medium collection. After centrifugation, the supernatants

were concentrated on Microsep 10K Omega filters (Pall, Ann Arbor, MI) and then separated on 7.5% polyacrylamide-SDS gel containing 0.1% gelatin. The gel was washed for 1 h at room temperature in a 2% Triton X-100 solution and incubated in buffer containing 50 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, 5 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.6), overnight at 37°C under gentle stirring. The gel was stained for 30 min in a 0.1% Coomassie blue (Sigma), 40% methanol, and 10% acetic acid solution and washed for 18 h in a buffer containing 10% acetic acid and 20% methanol for destaining. Finally, the gel was transferred to a solution of 10% acetic acid and 5% glycerol before drying. Signal intensity was analyzed by Multigauge software.

**Trans epithelial short-circuit ion currents in Ussing chamber.** Trans epithelial ion currents through NuLi and CuFi cell layers was studied by short-circuit current ( $I_{sc}$ ) measurement in an Ussing chamber (40, 58). Cells were cultured on filters until they reached the air-liquid interface and formed a polarized epithelium with high resistance ( $>1,200 \Omega\text{-cm}^2$ ). The filters were then treated or not (on the basolateral side) with TNF- $\alpha$ , 24 h before the experiment. After being washed, the filters were mounted in a heated Ussing chamber and bathed with warm physiological solution.

**Statistics.** Experiments on NuLi and CuFi cells were conducted in parallel, in control and TNF- $\alpha$  conditions (paired experiments), and repeated a number of times (on different passages) indicated in each figure legend. The data are reported as means (of these repeat experiments)  $\pm$  SE. Groups were compared by paired or one-group *t*-test (as indicated in each figure legend) with Statview software (SAS Institute, Cary, NC). Probability of  $P < 0.05$  was considered to be significant.

## RESULTS

**Impact of TNF- $\alpha$  on basal and EGF-stimulated bronchial wound healing.** The repair processes of NuLi and CuFi epithelia were studied in our model (58) of mechanical wound injury. We first confirmed (58) that the wound-healing rate in CuFi ( $25.9 \pm 4.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$ ) monolayers was slower than in NuLi ( $72.2 \pm 8.1 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$ ) monolayers in complete BEGM containing 0.5 ng/ml EGF (BEGM<sup>+EGF</sup>, Fig. 1A). The impact of TNF- $\alpha$  (40 ng/ml in BEGM<sup>+EGF</sup>, applied at T0 after injury) on wound closure was then tested in NuLi and CuFi monolayers over a 6-h period (Fig. 1A). We first verified that this TNF- $\alpha$  concentration elicited no cytotoxicity, evaluated by counting detached cells and by the Trypan blue exclusion test. We observed that TNF- $\alpha$  exposure, in the presence of EGF, slightly but not significantly affected the NuLi and CuFi wound-repair rates (Fig. 1A).

In the absence of exogenous EGF stimulation (i.e., BEGM<sup>+EGF</sup> replaced by BEGM<sup>EGF-free</sup> at T0 after injury, Fig. 1B), we noted that NuLi and CuFi wound closure rates were 2.5- and 1.4-fold slower, respectively, than in BEGM<sup>+EGF</sup> (compare control conditions in Fig. 1, A and B). These results confirmed our previous findings showing the involvement of EGF in bronchial repair and the lower response to EGF in repairing CuFi cells (58). Furthermore, a 5 ng/ml TNF- $\alpha$  concentration significantly stimulated the repair rate of NuLi ( $25.9 \pm 3.9 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$  in the control condition to  $35.3 \pm 4.6 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$  in the presence of TNF- $\alpha$ ,  $n = 9$ ,  $P < 0.01$ ) and CuFi ( $16.8 \pm 2.0 \times 10^3$  and  $25.6 \pm 2.9 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$  in control and TNF- $\alpha$  conditions, respectively,  $n = 9$ ,  $P < 0.003$ ). TNF- $\alpha$ , at 40 ng/ml (in BEGM<sup>EGF-free</sup>, applied at T0 after injury) elicited a higher stimulatory effect. Indeed, it enhanced the wound-repair rate in both NuLi (from  $25.9 \pm 3.9 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$  in the absence of TNF- $\alpha$  to  $43.6 \pm 3.7 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$  in its presence,  $n = 9$ ,  $P < 0.002$ ) and CuFi (from  $16.8 \pm 2.0 \times$

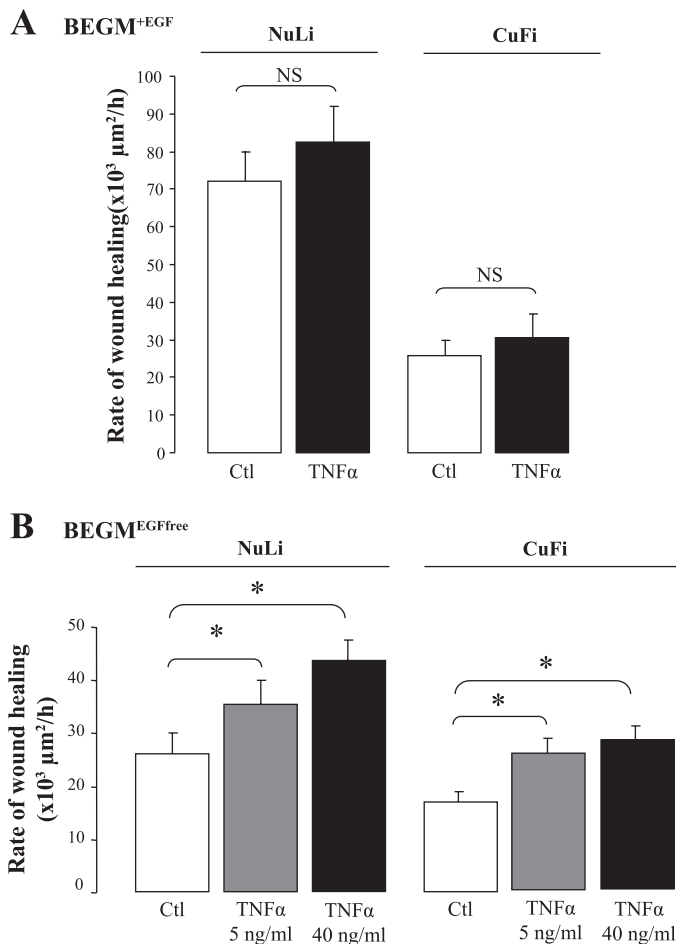
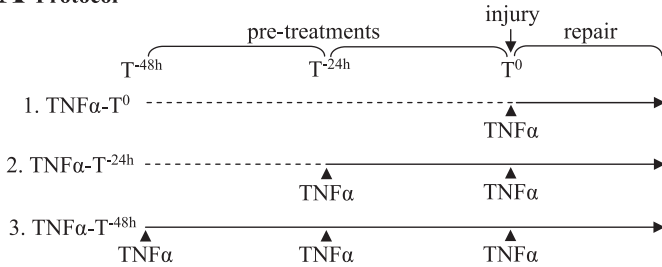


Fig. 1. Effect of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  on wound healing of NuLi (non-cystic fibrosis, non-CF) and CuFi (CF) bronchial cell monolayers. The wound-repair rate ( $\mu\text{m}^2/\text{h}$ ) in NuLi and CuFi was followed over a 6-h period in bronchial epithelial cell growth medium supplemented with epidermal growth factor (BEGM<sup>+EGF</sup>) (A,  $n = 10$ ) and an 18-h period in BEGM<sup>EGF-free</sup> (B,  $n = 22$ ) in the absence (Ctl) or presence of TNF- $\alpha$  [TNF- $\alpha$ , 5 (B) and 40 (A and B) ng/ml]. \*(Ctl vs. TNF- $\alpha$ ):  $P < 0.01$  (paired *t*-test). NS, nonsignificant.

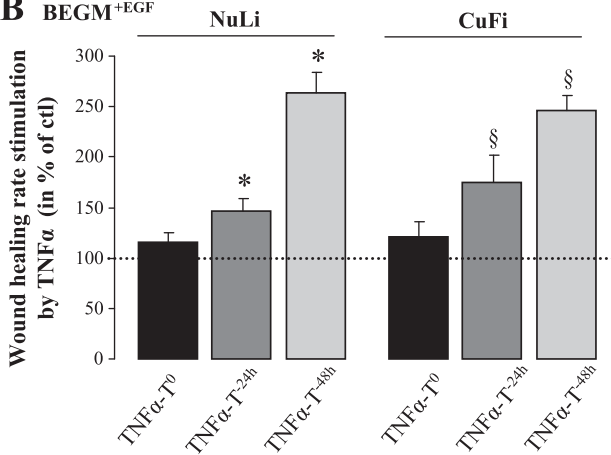
$10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$  to  $28.1 \pm 2.6 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$ ,  $P < 0.0001$ ) monolayers (Fig. 1B).

**Stimulation of bronchial wound repair by chronic TNF- $\alpha$  treatments.** Given that CF airways are chronically exposed to TNF- $\alpha$ , we evaluated the effect of longer TNF- $\alpha$  treatments. The acute action of TNF- $\alpha$ , applied at T0 after injury (protocol 1, TNF- $\alpha$ -T<sup>0</sup>, Fig. 2A), was compared with chronic treatment for 24 h (protocol 2, TNF- $\alpha$ -T<sup>24h</sup>) and 48 h (protocol 3, TNF- $\alpha$ -T<sup>48h</sup>) before injury. The TNF- $\alpha$ -induced repair rate was compared with control, untreated monolayers, in the presence (BEGM<sup>+EGF</sup>, Fig. 2B) and absence (BEGM<sup>EGF-free</sup>, Fig. 2C) of EGF. Although acute TNF- $\alpha$  had no significant influence on wound closure in BEGM<sup>+EGF</sup> (Fig. 2B, TNF- $\alpha$ -T<sup>0</sup>), chronic treatments enhanced both NuLi and CuFi repair. Indeed, wound-closure rates were stimulated by 1.46-fold (NuLi, TNF- $\alpha$ -T<sup>24h</sup>,  $P < 0.02$ ) and 1.75-fold (CuFi, TNF- $\alpha$ -T<sup>24h</sup>,  $P < 0.03$ ) with 24-h TNF- $\alpha$  pretreatments and 2.60-fold (NuLi, TNF- $\alpha$ -T<sup>48h</sup>,  $P < 0.0003$ ) and 2.46-fold (CuFi, TNF- $\alpha$ -T<sup>48h</sup>,  $P < 0.0001$ ) with 48-h pretreatments (Fig. 2B,  $n = 6$ ). In the absence of EGF (Fig. 2C), chronic exposure to TNF- $\alpha$

**A Protocol**



**B BEGM<sup>+EGF</sup>**



**C BEGM<sup>EGF-free</sup>**

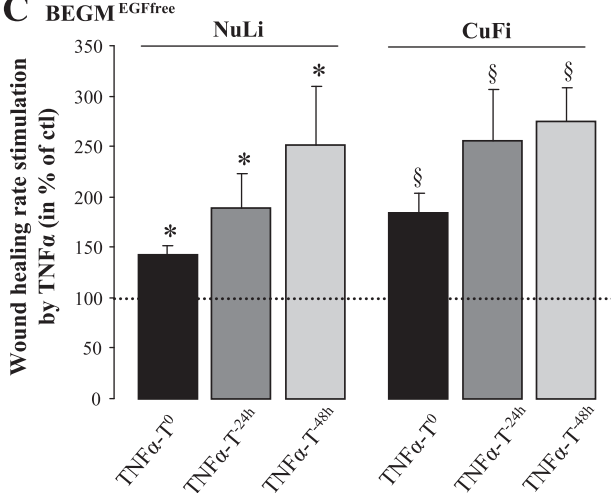


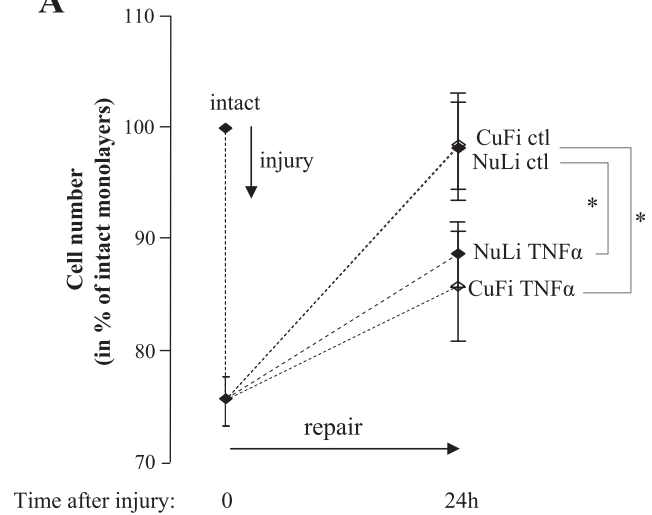
Fig. 2. Stimulation of wound repair by chronic treatments with TNF- $\alpha$  in NuLi and CuFi bronchial monolayers. A: experimental protocols: the first group of NuLi and CuFi was treated with TNF- $\alpha$  (40 ng/ml) at T0 after injury (protocol 1: no pretreatment, TNF- $\alpha$ -T<sup>0</sup>); the second group was treated twice (protocol 2: at 24 h before injury and T0, TNF- $\alpha$ -T<sup>24h</sup>), and the third group was treated 3 times (protocol 3: at 48 h and 24 h before wounding and T0, TNF- $\alpha$ -T<sup>48h</sup>). TNF- $\alpha$  pretreatments were administered in BEGM<sup>+EGF</sup>, and the wound-closure rate was evaluated in BEGM<sup>+EGF</sup> (6-h repair, B) or BEGM<sup>EGF-free</sup> (BEGM<sup>+EGF</sup> replaced by BEGM<sup>EGF-free</sup> at T0 after wounding, 18 h of repair, C) and compared with control, untreated monolayers. Repair rate stimulation by TNF- $\alpha$  was then reported as a percentage of control monolayers in BEGM<sup>+EGF</sup> (B,  $n = 6$ ) and BEGM<sup>EGF-free</sup> (C,  $n = 6$ ). \*(difference compared with NuLi Ctl):  $P < 0.04$ ;  $\S$ (difference compared with CuFi Ctl):  $P < 0.03$ , 1-group  $t$ -test.

also had a greater effect (1.89- and 2.52-fold stimulation with 24- and 48-h pretreatments,  $n = 7$ ,  $P < 0.05$ ) on the NuLi wound-repair rate than acute treatment (1.39-fold stimulation,  $P < 0.003$ , Fig. 2C). Similar results were obtained for the CuFi

wound-healing rate that was enhanced by 2.56- and 2.74-fold after 24- and 48-h TNF- $\alpha$  pretreatments ( $n = 6$ ,  $P < 0.03$ ) compared with control CuFi monolayers (Fig. 2C).

*Regulation of bronchial cell proliferation and migration by TNF- $\alpha$  during repair.* To further investigate the mechanisms involved in TNF- $\alpha$ -enhanced repair, we evaluated the effect of TNF- $\alpha$  on cell growth and migration, the first cellular processes engaged during wound healing in our in vitro assay as well as during epithelial regeneration in vivo (48, 49). Cell proliferation during repair was assessed first. A mean of  $2.3 \pm 0.3 \times 10^6$  cells was counted in NuLi and CuFi monolayers before wounding. Monolayer wounding resulted in a 25% decrease in total number of cells (Fig. 3A). In the control condition, cell growth during 24-h repair allowed the recovery of a number of cells similar to that measured before wounding ( $98.4 \pm 3.9$  and  $98.2 \pm 4.8\%$  in NuLi and CuFi in BEGM<sup>EGF-free</sup>, respectively,  $n = 10$ ). Cell growth was, however, significantly slower in the

**A**



**B**

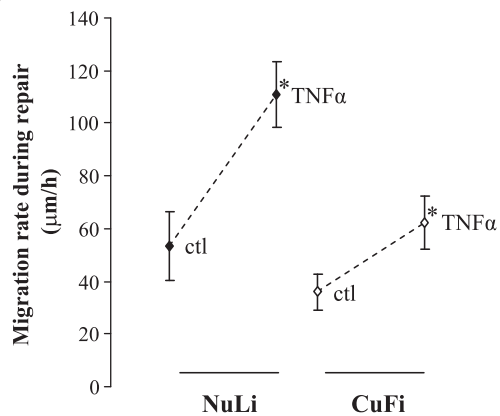


Fig. 3. Regulation of cell proliferation and migration during repair. A: number of NuLi and CuFi cells in confluent monolayers, counted after cell separation by trypsinization, was determined before (intact) and after injury as well as after 24 h of repair in the absence (Ctl) or presence of TNF- $\alpha$ . \*(Ctl vs. TNF- $\alpha$ ):  $P < 0.008$ ,  $n = 10$  (paired  $t$ -test). B: cell migration after wounding was evaluated by tracking of single repairing NuLi and CuFi cells (30 cells at the wound edge/experiment,  $n = 5$ ) in the absence (Ctl) or presence of TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , 40 ng/ml). \*(Ctl vs. TNF- $\alpha$ ):  $P < 0.05$  (paired  $t$ -test).

presence of TNF- $\alpha$  ( $88.5 \pm 3.0$  and  $85.7 \pm 4.9\%$  of the initial number of NuLi and CuFi after 24 h of repair, respectively,  $P < 0.008$ ).

To focus on cell migration (and avoid any significant cell proliferation), smaller wounds were produced in time-lapse experiments (Fig. 3B). Quantification of the mean cell migration rate from single, randomly selected cells tracked on each side of the wound edge revealed that TNF- $\alpha$  exposure accelerated NuLi cell migration ( $111 \pm 13 \mu\text{m/h}$ ) compared with nontreated cells ( $54 \pm 13 \mu\text{m/h}$ ,  $P < 0.05$ ). CuFi cell migration ( $36 \pm 7 \mu\text{m/h}$ ) was also stimulated by TNF- $\alpha$  ( $62 \pm 10 \mu\text{m/h}$ ,  $P < 0.01$ ). Our data suggested that stimulation of the wound-healing rate observed in the presence of TNF- $\alpha$  might derive from upregulation of bronchial cell migration, despite reduced cell growth. Subsequent experiments were then designed to clarify the mechanisms and signaling pathways involved in TNF- $\alpha$ -induced repair stimulation.

*Role of metalloproteinases in the regulation of bronchial wound healing by TNF- $\alpha$ .* Indirect activation of different types of metalloproteinases (MMPs and ADAMs) after TNF- $\alpha$  stimulation has been reported (2, 15, 65). These proteases are involved in cell migration and repair, by degrading the ECM and by releasing and activating growth factors (including EGF) in epithelial cells (8, 14, 27, 39, 43, 64). We then decided to evaluate the relationship between TNF- $\alpha$  responses and metalloproteinase activity during repair, in NuLi and CuFi cells, in the absence of exogenous EGF prestimulation. MMPs were assessed by gelatinase zymography, which showed that 92-kDa proform MMP-9 and mature 86-kDa MMP-9 were virtually undetectable in conditioned medium collected from nontreated NuLi and CuFi monolayers (Fig. 4A). Interestingly, TNF- $\alpha$  highly stimulated pro-MMP-9 and MMP-9 release in intact and wounded NuLi and CuFi monolayers (Fig. 4A,  $n = 6$ ,  $P < 0.008$ ). This effect was partially reversed by GM6001, a broad-spectrum metalloproteinase inhibitor (Fig. 4A,  $P < 0.04$ ). The role of metalloproteinase activity in TNF- $\alpha$ -induced bronchial repair stimulation was then examined. We observed that GM6001 severely reduced NuLi and CuFi wound-healing rates in basal (Fig. 4B, GM,  $P < 0.02$ ) as well as in TNF- $\alpha$ -stimulated (GM+TNF- $\alpha$ ,  $P < 0.002$ ) conditions.

*Involvement of secreted EGF in TNF- $\alpha$ -induced wound-repair stimulation.* Because metalloproteinases are involved in growth factor release in many cell types (8, 43, 64), we decided to study EGF shedding, a major component of NuLi and CuFi repair (58), in basal and TNF- $\alpha$  conditions. As illustrated in Fig. 5A, EGF expression in the conditioned medium of NuLi and CuFi was increased significantly after exposure to TNF- $\alpha$  (3.1- and 2.5-fold increment in NuLi and CuFi, respectively,  $n = 5$ ,  $P < 0.005$ ). We then decided to examine the role of secreted EGF in TNF- $\alpha$ -induced repair stimulation. As illustrated in Fig. 5B, the addition of an EGF antibody (EGF-Ab, 5  $\mu\text{g/ml}$ ), to titrate shed EGF significantly reduced the basal wound-healing rate in both NuLi (from  $33.9 \pm 5.0 \times 10^3$  to  $20.2 \pm 4.8 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$  in the presence of EGF-Ab,  $n = 10$ ,  $P < 0.0005$ ) and CuFi monolayers (from  $18.7 \pm 4.0 \times 10^3$  to  $7.6 \pm 2.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$  with EGF-Ab,  $n = 10$ ,  $P < 0.002$ ). Moreover, TNF- $\alpha$  stimulation was completely abolished by EGF-Ab in NuLi and CuFi cells (EGF-Ab vs. EGF-Ab+TNF- $\alpha$ , Fig. 5B). These data indicated that the stimulatory effect of TNF- $\alpha$  depends on EGF secreted by bronchial cells.

*Coupling between the EGFR and TNF- $\alpha$  pathways during bronchial repair.* To demonstrate that TNF- $\alpha$  treatment may result in secondary activation of EGFR after EGF shedding, we examined the level of EGFR phosphorylation, in NuLi and CuFi extracts, treated or not for 15 min with TNF- $\alpha$  or EGF (positive control). TNF- $\alpha$  elicited 1.6- and 1.3-fold increases in the pEGFR/EGFR ratio in NuLi and CuFi cells, respectively (Fig. 6A,  $n = 9$ ,  $P < 0.03$ ), similarly to positive control EGF stimulation (Fig. 6A). Note that this TNF- $\alpha$  treatment did not modify EGFR expression in NuLi and CuFi cells. The involvement of EGFR activation in bronchial repair stimulation by TNF- $\alpha$  was then investigated. As reported in Fig. 6B, the erbB1 and erbB2 EGFR inhibitors AG-1478 and AG-825 (AG) significantly inhibited the basal wound-healing rate in NuLi ( $32.6 \pm 7.1 \times 10^3$  to  $17.7 \pm 6.7 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$  after EGFR inhibition,  $n = 7$ ,  $P < 0.002$ ) and CuFi ( $20.8 \pm 5.2 \times 10^3$  to  $8.8 \pm 1.5 \mu\text{m}^2/\text{h}$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.03$ ). In addition, EGFR inhibition completely blocked TNF- $\alpha$ -induced stimulation (Fig. 6B). Taken together, the results reported in Figs. 5 and 6 indicate possible cross-talk between TNF- $\alpha$  stimulation and the EGF/EGFR pathway.

*Relationship between TNF- $\alpha$  stimulation and K<sup>+</sup> channel function during bronchial repair.* Our previous work demonstrated that alveolar and bronchial repair as well as cell migration and proliferation depended on K<sup>+</sup> channel activity, coupled to EGFR signaling (57, 58). We then decided to investigate the relationship between TNF- $\alpha$  stimulation and K<sup>+</sup> channel activities. First, the effect of TNF- $\alpha$  on basolateral K<sup>+</sup> currents of NuLi and CuFi cell layers was evaluated in  $I_{\text{sc}}$  experiments in an Ussing chamber (Fig. 7A). Upon current stabilization, clofilium and glibenclamide were applied at the basolateral membrane (Fig. 7A) to block KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> channels, responsible for a major part of basolateral K<sup>+</sup> permeability in basal conditions (58). Clofilium- and glibenclamide-sensitive basolateral K<sup>+</sup> currents ( $I_{\text{ClofiGlib}}$ ) were compared in the control condition and after acute (10 min) or chronic (24 h) stimulation by TNF- $\alpha$ . Acute exposure to TNF- $\alpha$  slightly increased  $I_{\text{ClofiGlib}}$  ( $0.8 \pm 0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  increment,  $P < 0.02$ ,  $n = 5$ , data not shown) through NuLi layers, whereas it failed to significantly stimulate CuFi  $I_{\text{ClofiGlib}}$  currents ( $0.2 \pm 0.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , NS,  $n = 10$ , data not shown). Longer exposure to TNF- $\alpha$  (24-h pretreatment, Fig. 7A) resulted in significant stimulation of K<sup>+</sup> currents, as seen in representative  $I_{\text{sc}}$  traces, through NuLi (Fig. 7A, top) and CuFi (Fig. 7A, bottom) in control (Fig. 7A, left) and TNF- $\alpha$  (Fig. 7A, right) conditions. We recorded mean  $1.7 \pm 0.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $P < 0.01$ ) and  $3.1 \pm 0.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $P < 0.0006$ ) increases in  $I_{\text{ClofiGlib}}$  through NuLi and CuFi, respectively, after TNF- $\alpha$  application. Finally, the role of K<sup>+</sup> channel activity in TNF- $\alpha$ -stimulated wound healing was explored. The combination of clofilium (5  $\mu\text{M}$ ), glibenclamide (100  $\mu\text{M}$ ), and TRAM-34 (5  $\mu\text{M}$ ), respectively inhibitors of KvLQT1, K<sub>ATP</sub>, and KCa3.1 (which also participate in repair processes, Ref. 58), severely reduced NuLi ( $8.1 \pm 1.6 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$ ,  $n = 8$ ,  $P < 0.004$ ) and CuFi ( $7.7 \pm 1.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$ ,  $n = 8$ ,  $P < 0.0002$ ) basal wound healing (Fig. 7B). K<sup>+</sup> channel inhibition also abolished the wound-repair stimulation evoked by TNF- $\alpha$  in both NuLi and CuFi monolayers (Fig. 7B). Altogether, these data indicated that K<sup>+</sup> channel upregulation by TNF- $\alpha$  is involved in TNF- $\alpha$ -induced stimulation of bronchial repair.



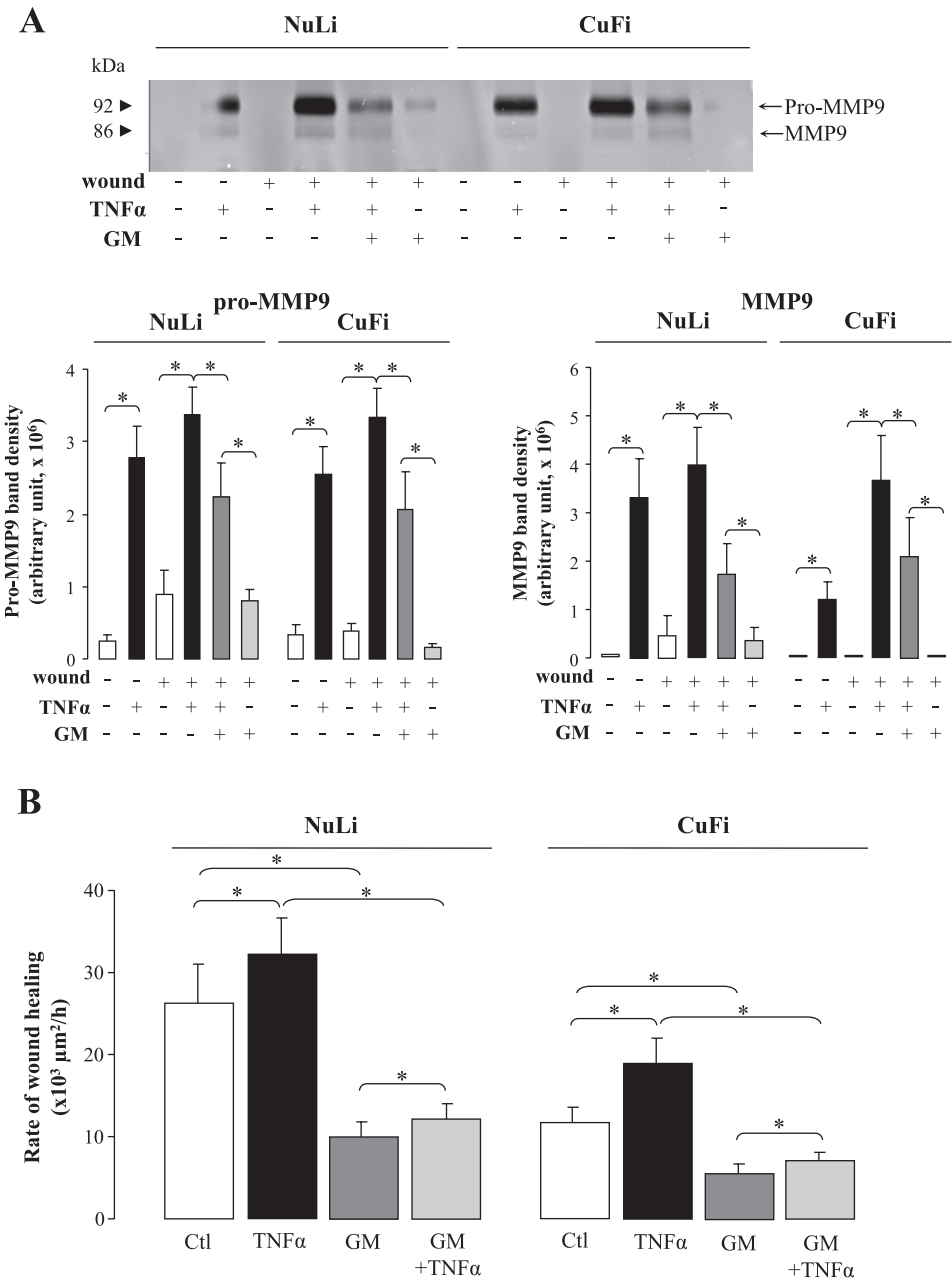


Fig. 4. Role of matrix metalloproteinase (MMP) in TNF- $\alpha$ -induced bronchial wound repair. **A:** intact or wounded NuLi and CuFi cell monolayers were treated for 24 h in BEGM<sup>EGF-BPE-free</sup>, in the presence or absence of TNF- $\alpha$  (40 ng/ml) and/or GM6001 (GM, 25  $\mu$ M), before conditioned medium collection. Pro-MMP-9 and MMP-9 in these conditioned media were then assessed by gelatin substrate zymography ( $n = 6$ ). A representative gelatin zymograph is presented (note that the gel image has been inverted for illustration purposes, i.e., dark background with light bands turned into light background with dark bands). **B:** NuLi and CuFi cell monolayers were injured mechanically, and the wound-healing rate ( $\mu$ m<sup>2</sup>/h) was measured after 18 h (BEGM<sup>EGF-free</sup>) in control monolayers (Ctl) and in monolayers treated with TNF- $\alpha$  (40 ng/ml, TNF- $\alpha$ ) and/or GM6001 (GM, 25  $\mu$ M). \* $P < 0.02$  (paired  $t$ -test),  $n = 12$ .

*Physiological impact of TNF- $\alpha$  on human primary non-CF and CF airway epithelial cells.* After the identification of TNF- $\alpha$ -stimulated wound repair in bronchial cell lines, we assessed the physiological impact of this cytokine in primary epithelial cells, isolated from human non-CF and CF airway tissues. We first confirmed that wound repair was slower in CF than in non-CF monolayers (Fig. 8). Furthermore, TNF- $\alpha$  markedly stimulated both non-CF (from  $37.7 \pm 8.1 \times 10^3 \mu$ m<sup>2</sup>/h in the absence to  $81.0 \pm 1.8 \times 10^3 \mu$ m<sup>2</sup>/h in the presence of TNF- $\alpha$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.04$ ) and CF airway monolayers ( $22.0 \pm 2.1 \times 10^3$  and  $41.8 \pm 4.7 \times 10^3 \mu$ m<sup>2</sup>/h before and after TNF- $\alpha$  stimulation,  $n = 5$ ,  $P < 0.02$ ).

**DISCUSSION**

Proinflammatory cytokines exert opposing actions on several cellular responses, including initiation and propagation of

inflammation, as well as the regulation of proliferation and migration processes. We thus postulated that TNF- $\alpha$ , a major cytokine in CF airways, could modulate the repair mechanisms of bronchial epithelia after injury. Our results demonstrated, for the first time, that acute and chronic exposure to TNF- $\alpha$  stimulated wound-healing rates in NuLi and CuFi cell lines as well as in primary human non-CF and CF airway cell monolayers. Although cell growth during repair was reduced by TNF- $\alpha$ , upregulation of bronchial cell migration was observed and was probably responsible for acceleration of the wound-closure rate. Our data indicated that cross-talk between the TNF- $\alpha$  and EGFR transduction pathways may be involved in this stimulation. In addition to the EGF response, K<sup>+</sup> channel function seems important for TNF- $\alpha$ -stimulated bronchial repair. Besides its well-known action on propagation of the inflammatory response, leading to progressive damage of the

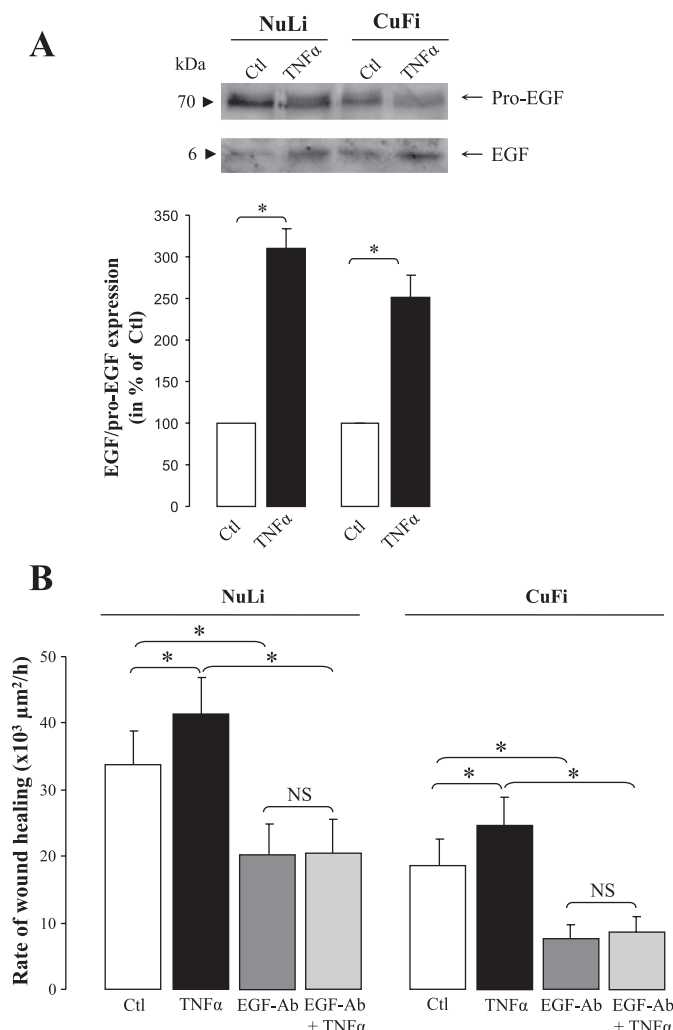


Fig. 5. Role of secreted EGF in TNF- $\alpha$ -induced bronchial wound-repair stimulation. **A**: NuLi and CuFi cell monolayers were treated or not for 24 h with TNF- $\alpha$  (40 ng/ml, in BEBM) before conditioned medium collection. Pro-EGF and EGF expression, in these conditioned media, was then analyzed by Western blotting, with anti-EGF antibody (Ab). A representative immunoblot is reported with the mean EGF/pro-EGF ratio (in % of Ctl,  $n = 5$ ,  $P < 0.005$ ). **B**: NuLi and CuFi cell monolayers were injured mechanically, and the wound-healing rate ( $\mu\text{m}^2/\text{h}$ ) was measured after 18 h (in BEGM<sup>EGF-free</sup>) in control monolayers (Ctl) and in monolayers treated with TNF- $\alpha$  (40 ng/ml, TNF- $\alpha$ ) and/or EGF-Ab (titrating shed EGF, EGF-Ab, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) \* $P < 0.04$  (paired  $t$ -test),  $n = 10$ .

respiratory epithelium, TNF- $\alpha$  thus controls the repair processes of CF airway epithelia.

**Regulation of repair mechanisms by the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$ .** Our wound-healing assays first confirmed, as we reported previously (58), that the repair rate in CuFi was slower than in NuLi. The repair mechanisms in NuLi and CuFi monolayers were compared more extensively in our previous paper (58), which documented a lower CuFi migration rate associated with reduced expression and function of K<sup>+</sup> channels as well as weaker EGF responses during repair. Consistently, a greater increase in the wound-healing rate was observed after EGF stimulation in NuLi than in CuFi cells. The basic CFTR defect could also be involved in delayed CF repair, as indicated in recent studies by Schiller et al. (50) and our laboratory (56). Moreover, wound-healing assays in human

primary CF airway epithelial cells have confirmed a delay in repair in CF compared with non-CF monolayers (Fig. 8).

Our experiments also show that acute TNF- $\alpha$  accelerated both NuLi and CuFi bronchial wound healing (Fig. 1). Because chronic inflammation favors epithelial injury, we postulated that chronic exposure to TNF- $\alpha$  might decrease epithelial repair capacity. However, we did not detect significant TNF- $\alpha$  cytotoxicity on confluent bronchial monolayers during repair. Moreover, TNF- $\alpha$  pretreatment had a greater stimulatory effect on wound healing than acute exposure to TNF- $\alpha$  (Fig. 2). Our data also disclosed (Fig. 3B) that cell migration, the first process engaged after injury, was accelerated by TNF- $\alpha$ . We noted, however, that TNF- $\alpha$  stimulation of the migration rate was lower in CuFi than in NuLi (compare the slopes in Fig.

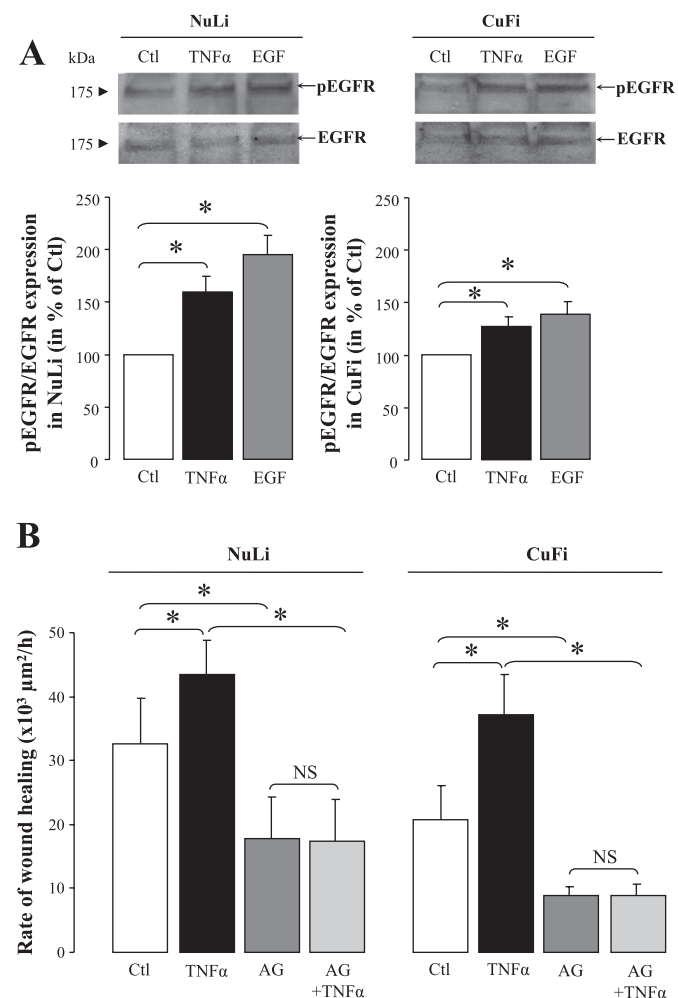


Fig. 6. Involvement of EGF receptor (EGFR) activation in TNF- $\alpha$ -induced stimulation of bronchial wound repair. **A**: EGFR expression and EGFR tyrosine kinase phosphorylation were measured by immunoblotting, with EGFR and anti-phospho-EGFR<sup>845</sup> antibodies, in extracts from NuLi and CuFi monolayers cultured for 18 h with BEGM<sup>EGF-BPE-free</sup> before protein extraction and exposed or not for 15 min to TNF- $\alpha$  (40 ng/ml) or EGF (25 ng/ml, positive control). Representative immunoblots as well as the mean pEGFR/EGFR ratio (presented as % of control nontreated cells) are reported for TNF- $\alpha$  and EGF conditions. NuLi \* $P < 0.007$ , CuFi \* $P < 0.03$  (paired  $t$ -test),  $n = 8$ . **B**: NuLi and CuFi monolayers were injured mechanically, and the rate of wound healing (in  $\mu\text{m}^2/\text{h}$ ) was measured after 18 h (BEGM<sup>EGF-free</sup>) in control (Ctl) and TNF- $\alpha$  (40 ng/ml, TNF- $\alpha$ ) and/or erbB1 and erbB2 inhibitor (AG-1478, 10  $\mu\text{M}$ ) + (AG-825, 10  $\mu\text{M}$ ) (AG)-treated monolayers. \* $P < 0.002$  (paired  $t$ -test),  $n = 7$ .

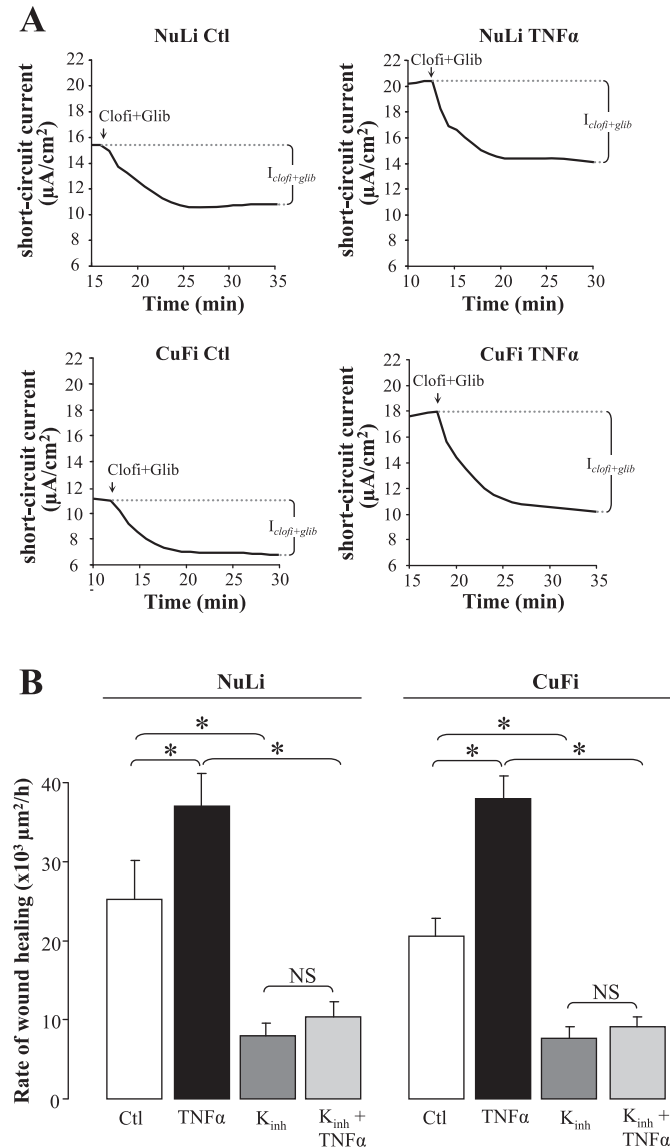


Fig. 7. Coupling between  $K^+$  channel activity and TNF- $\alpha$  stimulation during bronchial wound healing. *A*: NuLi and CuFi cells were cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated or not for an additional 24 h on the basolateral side with TNF- $\alpha$  (40 ng/ml), before short-circuit current ( $I_{sc}$ ). Upon current stabilization, clofilium and glibenclamide were applied, to evaluate  $K_{VLQT1}$  and  $K_{ATP}$  currents ( $I_{Clofi+Glib}$ ). Representative  $I_{sc}$  traces are reported for each condition (NuLi Ctl, NuLi TNF- $\alpha$ , CuFi Ctl, and CuFi TNF- $\alpha$ ). *B*: NuLi and CuFi cell monolayers were injured mechanically, and the rate of wound healing (in  $\mu\text{m}^2/\text{h}$ ) was measured after 18 h (in BEGM<sup>EGF-free</sup>) in control monolayers (Ctl) and in monolayers treated with TNF- $\alpha$  (40 ng/ml, TNF- $\alpha$ ) and/or clofilium (5  $\mu\text{M}$ ), glibenclamide (100  $\mu\text{M}$ ), and TRAM-34 (5  $\mu\text{M}$ ), applied in combination ( $K_{inh}$ ). \* $P < 0.04$  (paired  $t$ -test),  $n = 8$ .

3B). Consistently, wound healing remained lower in CuFi than in NuLi after TNF- $\alpha$  stimulation (Fig. 1). We also saw that cell growth in repairing monolayers was reduced by TNF- $\alpha$  (Fig. 3A). Thus the observed TNF- $\alpha$  stimulation of wound closure is most probably consecutive to enhanced cell migration.

Although 5 to 100 ng/ml TNF- $\alpha$  concentrations are commonly used in cell proliferation and migration as well as in epithelial repair assays (2, 10, 15, 55, 59), the 40 ng/ml TNF- $\alpha$  dose tested in our study is fairly high. We noted, however, that 5 ng/ml TNF- $\alpha$  was sufficient to stimulate bronchial wound

healing. This concentration is similar to the TNF- $\alpha$  levels detected in the bronchoalveolar lavage (BAL) of patients with acute respiratory distress syndrome (46, 54) or pneumonia (19), in BAL or sputum from patients with CF (9, 37), as well as in BAL from mice infected with *Streptococcus pneumoniae* (5). In fact, from cytokine measurements in BAL, it is difficult to extrapolate to which TNF- $\alpha$  dose epithelial cells are exposed locally. In infected mice, for example, a maximum of 5 ng/ml TNF- $\alpha$  was found in BAL, whereas levels up to 34 ng/ml were detected in lung tissues (5). Our findings thus indicate that TNF- $\alpha$ , at concentrations close to those encountered in several lung pathologies, could regulate the repair processes of airway epithelia.

The literature reports some paradoxical data on TNF- $\alpha$  as a regulator of proliferative and migratory responses. Our results, which highlight that TNF- $\alpha$  decreases NuLi and CuFi cell growth, are consistent with inhibition of alveolar cell proliferation (6), whereas proliferative effects of TNF- $\alpha$  have been noted in other cell types (2, 15, 59). In addition, several studies have also demonstrated that TNF- $\alpha$  upregulates the migration of epithelial cells, including mammary and alveolar cells (15, 41), in agreement with our time-lapse experiments. Although stimulation of cell migration by TNF- $\alpha$  may promote airway epithelial regeneration, other mechanisms, including cell proliferation and differentiation, are necessary for effective repair. Further investigation into the effect of TNF- $\alpha$  on these repair processes in vivo will be necessary to define the overall impact of TNF- $\alpha$  on CF airway regeneration after injury.

*Role of metalloproteinase and EGF release in TNF- $\alpha$ -induced wound-healing stimulation.* Several experiments were conducted to elaborate the mechanisms underlying TNF- $\alpha$ -mediated stimulation of bronchial wound-healing and cell-migration rates. Our results support a role of MMPs in wound-healing stimulation after TNF- $\alpha$  exposure. Indeed, gelatin zymography revealed pro- and active-MMP-9 release after TNF- $\alpha$  exposure in NuLi and CuFi cells (Fig. 4A), in agreement with other studies in skin and mammary epithelial cells (15, 65). TNF- $\alpha$  signaling has been shown to mediate secondary activation of other members of the metalloproteinase family, including ADAM-17 in hepatocytes (2) and the metalloela-

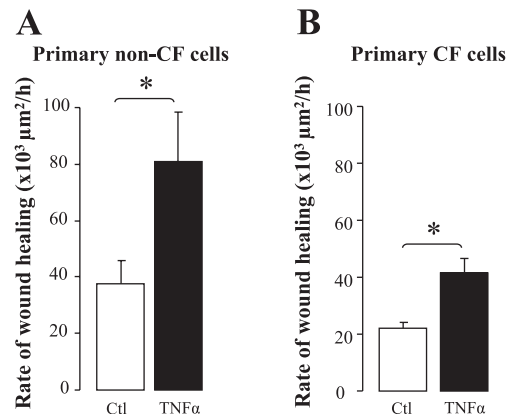


Fig. 8. Wound-repair stimulation by TNF- $\alpha$  in human primary non-CF and CF airway epithelial cells. Airway cells, isolated from non-CF ( $n = 5$ ) and CF patients ( $n = 5$ ), in primary culture, were injured mechanically, and the rate of wound healing (in  $\mu\text{m}^2/\text{h}$ ) was measured after 6 h in control monolayers (Ctl) and in monolayers treated with TNF- $\alpha$  (40 ng/ml, TNF- $\alpha$ ). \* $P < 0.04$ , (paired  $t$ -test).

stase MMP-12 in human bronchial cells (38). However, our casein zymography experiments did not disclose any MMP-12 activity in NuLi and CuFi (data not shown).

Our results also indicated that metalloproteinases are crucial for stimulation of the wound-healing rate after TNF- $\alpha$  treatment. Indeed, GM6001 severely inhibited basal repair and almost completely prevented TNF- $\alpha$ -induced repair (Fig. 4B). The involvement of MMPs, and particularly MMP-9, in airway wound repair and cell migration has already been reported in other studies (11, 39). In contrast, it has been shown that MMP-2 and MMP-9 in conditioned medium from tracheal cartilage inhibit the adherence and proliferation of tracheal epithelial cells, an effect prevented by GM6001 (53).

In addition to their role in ECM degradation and migration processes, MMPs and ADAMs are also involved in the release and maturation of cell surface pro-EGFR ligands into their active forms in many cell types (2, 8, 29, 33, 43, 64). Our data demonstrated for the first time that TNF- $\alpha$  treatment induced a subsequent decrease of the inactive pro-EGF form and evoked active EGF shedding by NuLi and CuFi cells (Fig. 5). In addition, the titration of released EGF, with an EGF-Ab, significantly reduced the basal wound-healing rate (Fig. 5B) and completely reversed TNF- $\alpha$ -induced stimulation, proving the role of EGF shedding in the regulation of bronchial repair by TNF- $\alpha$ . Beside growth factors, TNF- $\alpha$  could also induce secondary release of other cytokines, such as IL-1 $\beta$ , which has been shown to stimulate wound repair (25). We did not, however, observe any inhibitory effect of an IL-1 $\beta$  antibody, to titrate potentially secreted IL-1 $\beta$ , on basal as well as TNF- $\alpha$ -stimulated bronchial repair (data not shown).

**Cross-talk between the TNF- $\alpha$  and EGFR pathways.** Our data indicate EGFR transactivation after TNF- $\alpha$  exposure. Indeed, wound closure induced by TNF- $\alpha$  was prevented by both titrating-released EGF with an EGF antibody (Fig. 5B) and by inhibiting erbB1 and erbB2 EGFR tyrosine kinase activity (Fig. 6B). In addition, our Western blotting experiments revealed an increased pEGFR/EGFR ratio after 15-min TNF- $\alpha$  stimulation, indicating secondary EGFR activation by TNF- $\alpha$  (Fig. 6A). Such EGFR transactivation is a common phenomenon observed in the presence of inflammatory products, the virulence factor lipopolysaccharide, or oxidative stress in the airways (12, 36) and other epithelial cells (15, 62). However, our study demonstrated, for the first time, cross-talk between the TNF- $\alpha$  and EGFR pathways during wound repair in CF airway monolayers.

**Role of K<sup>+</sup> channels in TNF- $\alpha$ -induced wound-healing stimulation.** Ion channels, and in particular K<sup>+</sup> channels, control the mitogenic and motogenic properties of several cell types, via changes in cell volume, membrane potential, and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, or by directly interacting with proteins of the migratory machinery, such as integrins (1, 51). In the lungs, among over 30 different K<sup>+</sup> channels (4), KvLQT1 and K<sub>ATP</sub>, which are responsible for a major part of basolateral K<sup>+</sup> permeability, are essential in respiratory epithelial repair processes (57, 58). In addition, KCa3.1 channels could be stimulated after injury and may play a complementary role, with KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> channels, in basal bronchial repair (58). We discovered that simultaneous application of clofilium, glibenclamide, and TRAM-34, inhibitors of KvLQT1, K<sub>ATP</sub>, and KCa3.1, respectively, completely prevented TNF- $\alpha$ -induced stimulation (Fig. 7B). TRAM-34 is a specific KCa3.1 inhibitor, but clofilium and

glibenclamide could exert nonspecific effects. Indeed, CFTR and K<sub>ATP</sub> are both inhibited by glibenclamide. Furthermore, the CFTR channel could be engaged in bronchial repair, as indicated by recent data from Scott O'Grady's group (50) and our laboratory (56). However, our previous study (58) showed that glibenclamide, inhibiting basolateral K<sup>+</sup> current, significantly reduced wound repair, not only in NuLi but also in CuFi cells (lacking CFTR), clearly demonstrating K<sub>ATP</sub> channel involvement in basal wound repair. Clofilium has been used frequently in airway epithelia to study KvLQT1 channels (18, 20, 42, 44); however, this drug is also a blocker of Twik-related acid-sensitive K<sup>+</sup> (TASK) channels (31). Because higher clofilium concentrations (~100  $\mu$ M) are necessary to inhibit TASK channels (31, 47), we are quite confident that the suppressive effect of 5  $\mu$ M clofilium on wound repair (Fig. 7) is mainly due to its influence on KvLQT1. Moreover, we verified that chromanol 293B, which inhibits KvLQT1 (7, 26, 34, 45) but not TASK channels (24, 31), also reduced basolateral K<sup>+</sup> currents and wound repair (data not shown).

Interestingly, we found that 24-h treatment with TNF- $\alpha$  stimulated basolateral KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> K<sup>+</sup> currents (Fig. 7A), which could be explained by increased K<sup>+</sup> channel expression or trafficking to the membrane. In fact, conflicting results have been published describing the impact of TNF- $\alpha$  on K<sup>+</sup> channel activity and expression. For example, chronic TNF- $\alpha$  treatment evoked Kv1.3 but downregulated Kir2.1 expression in the brain (60). We determined previously that K<sup>+</sup> currents (57, 58) and expression (57) were upregulated by EGF, and the present study demonstrated that TNF- $\alpha$  evoked secondary EGF shedding (Fig. 5A). Thus it could be postulated that TNF- $\alpha$ -induced regulation of K<sup>+</sup> channels could be indirectly mediated by EGFR signaling. This hypothesis, however, needs to be verified.

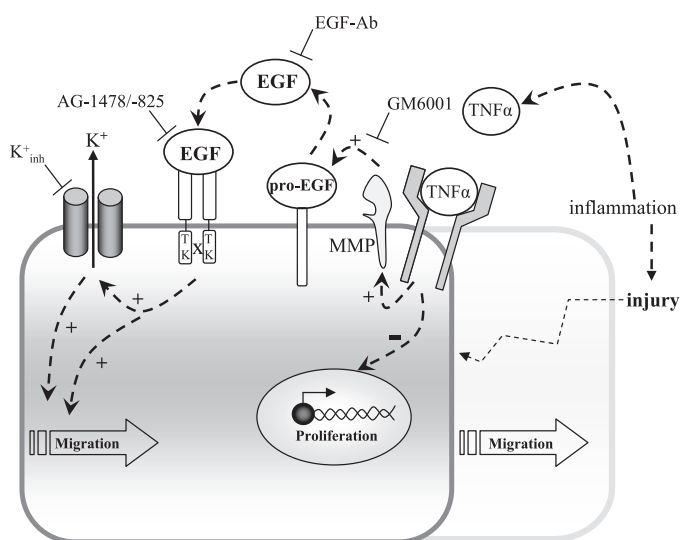


Fig. 9. Schematic model of TNF- $\alpha$  action on bronchial epithelial repair. In this model, we propose that the inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  induces secondary MMP-9 and EGF release, followed by EGFR activation, thus stimulating NuLi and CuFi cell migration and wound healing. Note that MMP-9 could also be directly involved in repair regulation through extracellular matrix degradation. Our results also indicate a relationship between TNF- $\alpha$  stimulation and K<sup>+</sup> channel function. In contrast, cell proliferation is reduced in the presence of TNF- $\alpha$ , suggesting a complex role of this proinflammatory cytokine in epithelial injury and repair processes.

Overall, our results revealed that TNF- $\alpha$  stimulated NuLi and CuFi bronchial wound repair as well as human primary non-CF and CF cell monolayers. Our findings also showed that TNF- $\alpha$  induced secondary release of MMP-9 and EGF, followed by EGFR activation as well as an increase of K<sup>+</sup> currents, as reported in our integrated model (Fig. 9). Moreover, TNF- $\alpha$ -stimulated wound closure was prevented by metalloproteinase inhibition, EGF titration, EGFR tyrosine kinase suppression, and K<sup>+</sup> channel blockade. Our data also disclose that TNF- $\alpha$  elicited an opposite effect on cell migration (up-regulation) and cell growth (downregulation).

Our study thus demonstrates that the role of TNF- $\alpha$  is far more complex than previously assumed. Intervention in CF airway inflammation may thus result in a beneficial action by controlling the inflammatory response but, on the other hand, could have some deleterious side-effects on innate immunity or some repair mechanisms. Several anti-inflammatory therapies have been tested in patients with CF. Among them, it has been postulated that anti-TNF- $\alpha$  therapies, developed for the management of rheumatoid arthritis, may be helpful in patients with CF (13, 16). In fact, whereas some studies on anti-inflammatory therapies have yielded encouraging results, others have failed to show an improvement in lung function or caused unacceptable adverse events (3, 16, 23). In fact, in light of our results, we think that further investigation is necessary to elaborate the overall effect of TNF- $\alpha$  and anti-TNF- $\alpha$  therapies on lung injury and repair.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Ryszard Grygorczyk for sharing his imaging system with us in time-lapse experiments. We acknowledge the help of Dr. Béatrice Nawrocki-Raby with her zymography protocol. The editorial work of Ovid Da Silva on this manuscript and logistical assistance from the Research Support Office, CRCHUM, are appreciated.

#### GRANTS

This study was funded by the Cystic Fibrosis Canada (operating grant to E. Brochiero and studentship to N. T. N. Trinh), the Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), the Faculty of Medicine, Université de Montréal (scholarship to E. Brochiero), the Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP), Université de Montréal, and the training program in respiratory health of the Respiratory Health Network and the Canadian Institutes of Health Research (studentships to E. Maillé).

#### REFERENCES

- Arcangeli A, Becchetti A. Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels. *Trends Cell Biol* 16: 631–639, 2006.
- Argast GM, Campbell JS, Brooling JT, Fausto N. Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication. *J Biol Chem* 279: 34530–34536, 2004.
- Balfour-Lynn IM. Anti-inflammatory approaches to cystic fibrosis airways disease. *Curr Opin Pulm Med* 13: 522–528, 2007.
- Bardou O, Trinh NT, Brochiero E. Molecular diversity and function of K<sup>+</sup> channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L145–L155, 2009.
- Bergeron Y, Ouellet N, Deslauriers AM, Simard M, Olivier M, Bergeron MG. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun* 66: 912–922, 1998.
- Besnard V, Nabeyrat E, Henrion-Caude A, Chadelat K, Perin L, Le Bouc Y, Clement A. Protective role of retinoic acid from antiproliferative action of TNF- $\alpha$  on lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L863–L871, 2002.
- Bleich M, Briel M, Busch AE, Lang HJ, Gerlach U, Gogelein H, Greger R, Kunzelmann K. KVLQT channels are inhibited by the K<sup>+</sup> channel blocker 293B. *Pflügers Arch* 434: 499–501, 1997.
- Blobel CP, Carpenter G, Freeman M. The role of protease activity in ErbB biology. *Exp Cell Res* 315: 671–682, 2009.
- Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, Berger M. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 2111–2118, 1995.
- Bove PF, Wesley UV, Greul AK, Hristova M, Dostmann WR, van der Vliet A. Nitric oxide promotes airway epithelial wound repair through enhanced activation of MMP-9. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 138–146, 2007.
- Buisson AC, Zahm JM, Polette M, Pierrot D, Bellon G, Puchelle E, Birembaut P, Tournier JM. Gelatinase B is involved in the in vitro wound repair of human respiratory epithelium. *J Cell Physiol* 166: 413–426, 1996.
- Burgel PR, Nadel JA. Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases. *Eur Respir J* 32: 1068–1081, 2008.
- Casserly B, Donat W. Stabilization of lung function and clinical symptoms in a patient with cystic fibrosis (CF) after institution of infliximab: a monoclonal antibody that binds tumor necrosis factor alpha. *Lung* 187: 149–152, 2009.
- Chen P, Parks WC. Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration. *J Cell Biochem* 108: 1233–1243, 2009.
- Chen WN, Woodbury RL, Kathmann LE, Opreko LK, Zangar RC, Wiley HS, Thrall BD. Induced autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor contributes to the response of mammary epithelial cells to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 279: 18488–18496, 2004.
- Chmiel JF, Konstan MW. Inflammation and anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 28: 331–346, 2007.
- Courtney JM, Ennis M, Elborn JS. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 3: 223–231, 2004.
- Cowley EA, Linsdell P. Characterization of basolateral K<sup>+</sup> channels underlying anion secretion in the human airway cell line Calu-3. *J Physiol* 538: 747–757, 2002.
- Dehoux MS, Boutten A, Ostinelli J, Seta N, Dombret MC, Crestani B, Deschenes M, Trouillet JL, Aubier M. Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 710–716, 1994.
- Devor DC, Bridges RJ, Pilewski JM. Pharmacological modulation of ion transport across wild-type and DeltaF508 CFTR-expressing human bronchial epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C461–C479, 2000.
- Dovey M, Wissemann CL, Roggli VL, Roomans GM, Shelburne JD, Spock A. Ultrastructural morphology of the lung in cystic fibrosis. *J Submicrosc Cytol Pathol* 21: 521–534, 1989.
- El Ani D, Zimlichman R. TNF $\alpha$  stimulated ATP-sensitive potassium channels and attenuated deoxyglucose and Ca uptake of H9c2 cardiomyocytes. *Ann NY Acad Sci* 1010: 716–720, 2003.
- Fayon M. CF-Emerging therapies: Modulation inflammation. *Paediatr Respir Rev* 7, Suppl 1: S170–S174, 2006.
- Fong P, Argent BE, Guggino WB, Gray MA. Characterization of vectorial chloride transport pathways in the human pancreatic duct adenocarcinoma cell line HPAF. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C433–C445, 2003.
- Geiser T, Jarreau PH, Atabai K, Matthay MA. Interleukin-1 $\beta$  augments in vitro alveolar epithelial repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1184–L1190, 2000.
- Grahamer F, Warth R, Barhanin J, Bleich M, Hug MJ. The small conductance K<sup>+</sup> channel, KCNQ1: expression, function, and subunit composition in murine trachea. *J Biol Chem* 276: 42268–42275, 2001.
- Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev* 87: 69–98, 2007.
- Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J Pathol* 211: 340–350, 2007.
- Hao L, Du M, Lopez-Campistrous A, Fernandez-Patron C. Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction through the epidermal growth factor-receptor pathway. *Circ Res* 94: 68–76, 2004.
- Hubeau C, Lorenzato M, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, Gaillard D. Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa. *Clin Exp Immunol* 124: 69–76, 2001.
- Inglis SK, Brown SG, Constable MJ, McTavish N, Oliver RE, Wilson SM. A Ba<sup>2+</sup>-resistant, acid-sensitive K<sup>+</sup> conductance in Na<sup>+</sup>-absorbing

- H441 human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L1304–L1312, 2007.
32. **Ingram JL, Bonner JC.** EGF and PDGF receptor tyrosine kinases as therapeutic targets for chronic lung diseases. *Curr Mol Med* 6: 409–421, 2006.
  33. **Kataoka H.** EGFR ligands and their signaling scissors, ADAMs, as new molecular targets for anticancer treatments. *J Dermatol Sci* 56: 148–153, 2009.
  34. **Kim JK, Yoo HY, Kim SJ, Hwang YS, Han J, Kim JA, Kim CS, Cho HS.** Effects of sevoflurane on the cAMP-induced short-circuit current in mouse tracheal epithelium and recombinant Cl<sup>-</sup> (CFTR) and K<sup>+</sup> (KCNQ1) channels. *Br J Anaesth* 99: 245–251, 2007.
  35. **Koehler DR, Downey GP, Swezey NB, Tanswell AK, Hu J.** Lung inflammation as a therapeutic target in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 377–381, 2004.
  36. **Koff JL, Shao MX, Kim S, Ueki IF, Nadel JA.** Pseudomonas lipopolysaccharide accelerates wound repair via activation of a novel epithelial cell signaling cascade. *J Immunol* 177: 8693–8700, 2006.
  37. **Kronborg G, Hansen MB, Svenson M, Fomsgaard A, Hoiby N, Bendtsen K.** Cytokines in sputum and serum from patients with cystic fibrosis and chronic Pseudomonas aeruginosa infection as markers of destructive inflammation in the lungs. *Pediatr Pulmonol* 15: 292–297, 1993.
  38. **Lavigne MC, Thakker P, Gunn J, Wong A, Miyashiro JS, Wasserman AM, Wei SQ, Pelker JW, Kobayashi M, Eppihimer MJ.** Human bronchial epithelial cells express and secrete MMP-12. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 534–546, 2004.
  39. **Legrand C, Polette M, Tournier JM, de Bentzmann S, Huet E, Monteau M, Birembaut P.** uPA/plasmin system-mediated MMP-9 activation is implicated in bronchial epithelial cell migration. *Exp Cell Res* 264: 326–336, 2001.
  40. **Leroy C, Dagenais A, Berthiaume Y, Brochiero E.** Molecular identity and function in transepithelial transport of K(ATP) channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L1027–L1037, 2004.
  41. **Lesur O, Arsalane K, Lane D.** Lung alveolar epithelial cell migration in vitro: modulators and regulation processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 270: L311–L319, 1996.
  42. **Lock H, Valverde MA.** Contribution of the Isk (MinK) potassium channel subunit to regulatory volume decrease in murine tracheal epithelial cells. *J Biol Chem* 275: 34849–34852, 2000.
  43. **Lucchesi PA, Sabri A, Belmadani S, Matrougui K.** Involvement of metalloproteinases 2/9 in epidermal growth factor receptor transactivation in pressure-induced myogenic tone in mouse mesenteric resistance arteries. *Circulation* 110: 3587–3593, 2004.
  44. **MacVinish LJ, Hickman ME, Mufti DA, Durrington HJ, Cuthbert AW.** Importance of basolateral K<sup>+</sup> conductance in maintaining Cl<sup>-</sup> secretion in murine nasal and colonic epithelia. *J Physiol* 510: 237–247, 1998.
  45. **Mall M, Gonska T, Thomas J, Schreiber R, Seydewitz HH, Kuehr J, Brandis M, Kunzelmann K.** Modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> secretion by basolateral K<sup>+</sup> channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Pediatr Res* 53: 608–618, 2003.
  46. **Meduri GU, Kohler G, Headley S, Tolley E, Stentz F, Postlethwaite A.** Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest* 108: 1303–1314, 1995.
  47. **Niemeyer MI, Cid LP, Barros LF, Sepulveda FV.** Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K<sup>+</sup> channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume. *J Biol Chem* 276: 43166–43174, 2001.
  48. **Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C.** Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 3: 726–733, 2006.
  49. **Sacco O, Silvestri M, Sabatini F, Sale R, Defilippi AC, Rossi GA.** Epithelial cells and fibroblasts: structural repair and remodelling in the airways. *Paediatr Respir Rev* 5, Suppl A: S35–S40, 2004.
  50. **Schiller KR, Maniak PJ, O'Grady SM.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C912–C921, 2010.
  51. **Schwab A, Nechyporuk-Zloy V, Fabian A, Stock C.** Cells move when ions and water flow. *Pflügers Arch* 453: 421–432, 2007.
  52. **Shute J, Marshall L, Bodey K, Bush A.** Growth factors in cystic fibrosis—when more is not enough. *Paediatr Respir Rev* 4: 120–127, 2003.
  53. **Sigurdson L, Sen T, Hall L 3rd, Rubinfeld A, Hard R, Gardella J, Bright F, Hicks WL Jr.** Possible impedance of luminal reepithelialization by tracheal cartilage metalloproteinases. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129: 197–200, 2003.
  54. **Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Dayer JM.** High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Respir Dis* 145: 1016–1022, 1992.
  55. **Takeda N, Sumi Y, Prefontaine D, Al Abri J, Al Heialy N, Al Ramli W, Michoud MC, Martin JG, Hamid Q.** Epithelium-derived chemokines induce airway smooth muscle cell migration. *Clin Exp Allergy* 39: 1018–1026, 2009.
  56. **Trinh NT, Maille E, Prive A, Brochiero E.** Defect in CF bronchial epithelial repair after injury: role of the CFTR channel. *Pediatr Pulmonol Suppl* 33: 254, 2010.
  57. **Trinh NT, Prive A, Kheir L, Bourret JC, Hijazi T, Amraei MG, Noel J, Brochiero E.** Involvement of K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 K<sup>+</sup> channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L870–L882, 2007.
  58. **Trinh NT, Prive A, Maille E, Noel J, Brochiero E.** EGF and K<sup>+</sup> channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L866–L880, 2008.
  59. **Varela LM, Stangle-Castor NC, Shoemaker SF, Shea-Eaton WK, Ip MM.** TNF $\alpha$  induces NF $\kappa$ B/p50 in association with the growth and morphogenesis of normal and transformed rat mammary epithelial cells. *J Cell Physiol* 188: 120–131, 2001.
  60. **Vicente R, Coma M, Busquets S, Moore-Carrasco R, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM, Felipe A.** The systemic inflammatory response is involved in the regulation of K<sup>+</sup> channel expression in brain via TNF- $\alpha$ -dependent and -independent pathways. *FEBS Lett* 572: 189–194, 2004.
  61. **Wei Y, Babilonia E, Pedraza PL, Ferreri NR, Wang WH.** Acute application of TNF stimulates apical 70-pS K<sup>+</sup> channels in the thick ascending limb of rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F491–F497, 2003.
  62. **Yamaoka T, Yan F, Cao H, Hobbs SS, Dise RS, Tong W, Polk DB.** Transactivation of EGF receptor and ErbB2 protects intestinal epithelial cells from TNF-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 11772–11777, 2008.
  63. **Zabner J, Karp P, Seiler M, Phillips SL, Mitchell CJ, Saavedra M, Welsh M, Klingelutz AJ.** Development of cystic fibrosis and noncystic fibrosis airway cell lines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L844–L854, 2003.
  64. **Zhao Y, He D, Saatian B, Watkins T, Spannhaake EW, Pyne NJ, Natarajan V.** Regulation of lysophosphatidic acid-induced epidermal growth factor receptor transactivation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells by protein kinase C $\delta$ , Lyn kinase, and matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 281: 19501–19511, 2006.
  65. **Zhou L, Yan C, Gieling RG, Kida Y, Garner W, Li W, Han YP.** Tumor necrosis factor- $\alpha$  induced expression of matrix metalloproteinase-9 through p21-activated kinase-1. *BMC Immunol* 10: 15, 2009.